SÉRIE C
N° d'ordre 22
N° de série 11

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre JOUAN

1re THÈSE : Recherches sur les relations thyro-cortico-surrénales.

2e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 9 Mars 1961 devant la Commission d'Examen.

MM. H. LE MOAL.....		*Président.*
J. ROCHE.....	}	*Examinateurs.*
J. VÈNE.....		
S. VILLERET.....		
M. CORMIER.....		

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1961

Série C
N° d'ordre 22
N° de série 11

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre JOUAN

1re THÈSE : Recherches sur les relations thyro-cortico-surrénales.

2e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 9 Mars 1961 devant la Commission d'Examen.

MM. H. LE MOAL..... *Président.*
J. ROCHE.....
J. VÈNE..... *Examinateurs.*
S. VILLERET.....
M. CORMIER.....

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE RENNES
FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen	N...
Assesseur	M. POISSON.
Doyens Honoraires	MM. BOUZAT, MILON, TREHIN, SCHMITT.
Professeurs Honoraires	MM. BOUZAT, CONDUCHE, ANTOINE, FREYMANN, TREHIN, LE MOAL.

PROFESSEURS TITULAIRES.

M. BRILLOUET Georges	Sciences Mathématiques.
Mlle CHARPENTIER Marie	
Mlle LIBERMANN Paulette	
MM. MARTIN Yves	
PAUC Christian	
LE BOT Jean	Sciences Physiques.
LE MONTAGNER Serge	
RAVILLY Emile	
ROBIN Stéphane	
SCHMITT Max	
VACHER Michel	
VIGNERON Léopold	
DUNOYER Jean.	Sciences Chimiques.
PELTIER Daniel	
SALMON-LEGAGNEUR François.	
VENE Jean	
HAGENE Philippe	Sciences Biologiques.
NICOLLON des ABBAYES Henri.	
POISSON Raymond	
RICHARD Gaston	
VAUGIEN Léon	
VILLERET Serge	
MILON Yves	Sciences de la Terre.

PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFÉRENCES.

MM.	BENZECRI Jean-Paul	Sciences Mathématiques.
	BOCLE Jean	
Mlle	DELAVAULT Huguette	
MM.	GLAESER Georges	
	GUERINDON Jean	
	LEGRAND Gilles	
	MOLINARO Italico	
	PETRESCU Julian	
	RIGUET Jacques	
	VIVIER Marcel	
	BALQUET Robert	Sciences Physiques.
	BOULLOUD André	
	COLLET Luc	
	GOBIN Francis	
	JOHANNIN Pierre	
Mme	JOHANNIN Andrée	
MM.	LERMUSIAUX Albert	
	MEINNEL Jean	
	MEVEL Jean-Yves	
	MEZENCEV Romane	
	MONOD-HERZEN Gabriel	
Mme	ODIOT Simone	
M.	PIRONNEAU Yves	
Mme	ROBIN Simone	
MM.	FOUCAUD André	Sciences Chimiques.
	GRAFF Pierre	
	LANG Paul	
	LEVAS Emile	
	PRIGENT Jacques	
	RIO Guy	
	VALLET Pierre	
	ALLEGRET Paul	Sciences Biologiques.
	BOISTEL Jacques	
	CLAUSTRES Georges	
Mlle	DEBRAUX Germaine	
Mlle	GOAS Marie	
MM.	MAILLET Pierre	
	SELLIER Robert	
Mlle	DURAND Suzanne	Sciences de la Terre.
M.	PHILIPPOT André	
Mlle	RENAUD Alzine	

Secrétaire Principal de la Faculté : M. BOURDIGUEL Robert.

Ces recherches sont affectueusement dédiées à ma femme, médecin-chef de la protection maternelle et infantile.

A Monsieur le Recteur H. LE MOAL.

RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE RENNES.

qui m'a fait le très grand honneur de présider le jury de cette thèse. Je prie, Monsieur le Recteur, d'agréer l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux dévouement.

A Mon Maître

Monsieur le Professeur J. ROCHE

PROFESSEUR AU COLLÈGE DE FRANCE

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

Mon cher Maître.

Les années passées dans votre laboratoire de Biochimie du Collège de France ont exercées une influence décisive sur mon avenir. Depuis vous n'avez cessé de me témoigner votre constante sollicitude. Six années d'amicale et confiante collaboration ont définitivement scellé mon attachement. Vous m'avez fait, mon cher Maître, le don de votre amitié, permettez-moi de vous exprimer en retour, l'assurance de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse affection.

A Monsieur le Professeur J. VÈNE

PROFESSEUR DE CHIMIE ORGANIQUE.

dont j'ai été l'élève, et qui a bien voulu considérer mes recherches avec une grande sympathie. Il m'est agréable de lui exprimer ici, mes sentiments de respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur S. VILLERET

PROFESSEUR DE BIOLOGIE VÉGÉTALE.

Qui m'a toujours réservé un accueil très bienveillant et dont l'affabilité m'a été si précieuse. Je le prie d'agréer l'expression de ma très vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. CORMIER

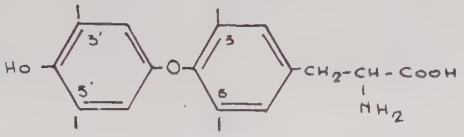
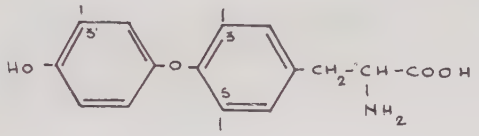
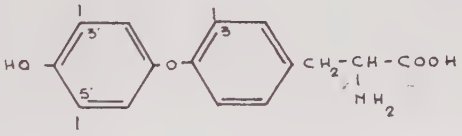
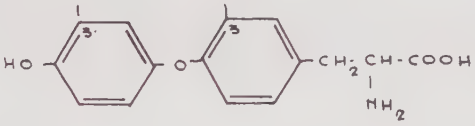
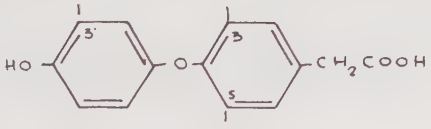
ASSESSEUR DE MONSIEUR LE DOYEN DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE RENNES.

dont la bienveillante sollicitude m'a permis d'entreprendre et de mener à bien ces travaux. Je suis heureux de lui exprimer mes sentiments de profonde reconnaissance pour l'aide qu'il n'a jamais cessé de m'accorder.

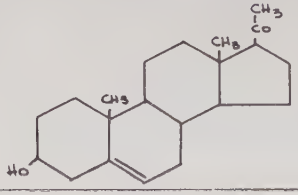
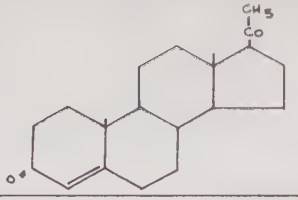
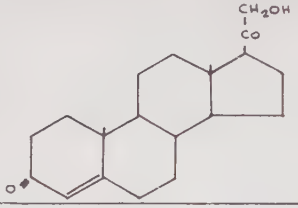
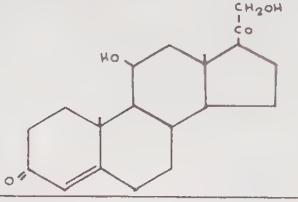
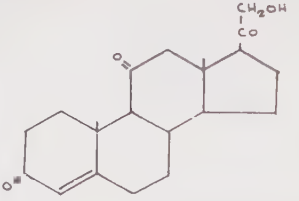
A Monsieur le Professeur R. MICHEL

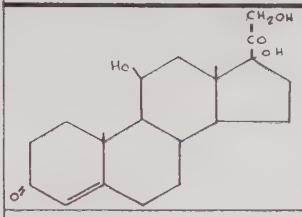
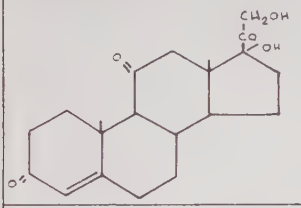
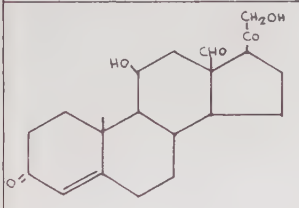
PROFESSEUR DE CHIMIE PHARMACEUTIQUE.

A qui je suis heureux d'exprimer ma très vive gratitude pour les conseils si utiles qu'il n'a cessé de me prodiguer et l'intérêt amical qu'il a porté à mes recherches.

FORMULES DES IODOTHYRONINES	
	3.5.3'.5' TETRAÏODOTHYRONINE (Thyroxine)
	3.5.3' TRIIODOTHYRONINE
	3.3'.5' TRIIODOTHYRONINE
	3.3' DIIODOTHYRONINE
	Acide 3.5.3' TRIIODOTHYROACETIQUE

FORMULES DES PRINCIPAUX CORTICOSTEROÏDES

Formules chimiques	Désignation chimique	Nom Usuel
	Δ_5. Prégnene . 3β. ol 20 one	Prégnénolone
	Δ4. Prégnène 3. 20. dione	Progestérone
	Δ4. Prégnène 21 ol 3, 20 dione	11. désoxycorticostérone
	Δ4 Prégnène. 11β, 21 diol 3. 20 dione	Corticostérone
	Δ4. Prégnène. 21 ol. 3, 11, 20. trione	11. déhydro. corticostérone

Formules chimiques	Désignation chimique	Nom Usuel
	Δ4. Prégnène 11β 17α, 21 triol. 3.20. dione	.17 hydroxy. corticosterone cortisol. composé F. Kendall
	Δ4. Prégnène-17α.21 diol. 3, 11, 20 trione	.11. dehydro.17 hydroxy corticostérone . cortisone . composé F. Kendall
	Δ4 Pregnène-18 al. 11β 21 diol 3.20. dione	Aldostérone

INTRODUCTION GÉNÉRALE.

Claude Bernard et Brown-Sequard introduisaient il y a un siècle la notion de glande à sécrétion interne. En 1901, Takamine et Aldrich isolent l'adrénaline des capsules surrénales et, quatorze ans plus tard, Kendall extrait de la poudre de thyroïde, la thyroxine, qui, pendant trente années, sera considérée comme l'unique hormone thyroïdienne. En 1921, le principe hypoglycémiant du pancréas est connu, après l'obtention de l'insuline par les canadiens Banting et Best. Les glandes génitales ne restent pas inexplorées. Successivement, Allen et Doisy aux U.S.A., Butenandt en Allemagne, Laqueur en Hollande, publient la découverte de l'œstrone en 1929. L'année suivante, l'œstriol fait son apparition grâce à Marrian et, en 1935, Doisy met un terme à l'isolement de la série des hormones ovariennes en découvrant l'œstradiol. C'est à cette époque que Reichstein à Bâle et Kendall aux Etats-Unis inaugurent la biochimie de la corticosurrénale en extrayant la 11-désoxycorticostérone, puis la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone. L'hypophyse est explorée par Smith. L'étude de ses propriétés physiologiques et biologiques permet de conclure à la diversité de ses activités stimulantes, prévisions justifiées et démontrées d'une façon éclatante par l'isolement de protéines hypophysaires chimiquement pures telles que la somatotrophine et la corticostimuline et celui d'hormones peptidiques comme l'ocytocine et la vasopressine.

Le développement rapide des techniques de l'analyse chimique et biologique, l'apparition de la chromatographie d'adsorption sur colonne et sur papier, l'utilisation d'isotopes et de molécules marquées ont donné une impulsion décisive à la chimie hormonale. La 3.5.3' triiodothyronine, nouvelle hormone thyroïdienne, cinq à dix fois plus active que la thyroxine, est découverte indépendamment, en 1952, par J. Roche, S. Lissitzky et R. Michel, par R. Pitt-Rivers et J. Gross. La pluralité des hormones de la thyroïde se trouve ainsi démontrée. Elle sera confirmée en 1955 par l'isolement de la

3.3'.diiodothyronine et de la 3.3'.5'.triiodothyronine par J. Roche et ses collaborateurs.

La fraction amorphe des extraits de la corticosurrénale est dissociée en divers corps actifs. L'aldostérone est obtenue à l'état cristallisé grâce à une fructueuse collaboration entre deux équipes de biochimistes, l'une Suisse, représentée par Neher, Wettstein, Reichstein et Von Euw, l'autre anglaise, dirigée par Tait et Simpson. Son efficacité dépasse celle de tous les stéroïdes connus auparavant.

L'effort des biochimistes ne se concentre pas seulement sur l'isolement des principes hormonaux. L'analyse de leurs constituants, leur synthèse organique sollicitent leur effort. Après Harrington et Barger, qui, en 1927, ont établi la constitution de la thyroxine et effectué la synthèse de cette 3.5.3'.5'. tétraiodothyronine, l'analyse de l'insuline est réalisée par Sanger et la synthèse de la vasopressine par Du Vigneaud. Ce rappel, volontairement limité, laisse soupçonner les incomparables découvertes de la chimie hormonale. Il va de soi que la caractérisation et la synthèse des hormones n'ont pas été la seule préoccupation des biochimistes, car, il importait aussi de préciser le rôle de ces substances. Elles possèdent, en effet, d'exceptionnelles propriétés : promouvoir la croissance corporelle et squelettique, assurer le développement sexuel, régler le métabolisme de l'eau et des sels minéraux ou des glucides, harmoniser les processus d'oxydo-réductions cellulaires. Toutes ces fonctions sont assurées par les différentes glandes endocrines, sous l'impulsion de l'hypophyse, elle-même soumise à un contrôle neuro-hormonal d'origine hypothalamique, et dont les stimulines régissent les sécrétions hormonales, ces dernières concourant, en retour, à régulariser l'activité de l'hypophyse.

Une premier type d'interrelations glandulaires se manifeste ainsi, mais il en existe d'autres. Tantôt les hormones agissent d'une manière synergique, tantôt elles se contrarient. La somatotrophine et la thyroxine agissent de concert. La cortisone freine la captation de l'iode par la thyroïde, alors que l'intégrité de cette dernière est nécessaire au bon fonctionnement de la corticosurrénale. Ces actions synergiques ou antagonistes sont associées avec une extrême précision. Elles représentent, en fait, l'activité hormonale au niveau des récepteurs cellulaires. Leur étude est primordiale et la biochimie cellulaire a suffisamment progressé au cours de ces dernières années pour que celle-ci puisse être poursuivie. C'est dans cette pers-

pective que nous avons tenté d'élucider le rôle des hormones thyroïdiennes sur la stéroïdogénèse corticosurrénalienne.

Le problème n'est pas nouveau. Il fut soulevé pour la première fois en 1910 par R. Hoskins [1]. Ajoutant de la poudre de thyroïde au régime alimentaire de cobayes, il constata l'existence d'une hypertrophie des surrénales. L'augmentation pondérale de ces glandes, atteignant 25 p. 100, était significative. Ce travail amena son auteur à considérer la sécrétion thyroïdienne comme nécessaire à l'activité des surrénales, affirmation qui aurait pu paraître hâtive à une époque où l'on ne connaissait ni les hormones du corps thyroïdien ni celles des surrénales.

Dix-huit ans plus tard, la question est reprise par D. Ingle et G. Higgins [2]. Au cours de recherches originales, ceux-ci montrent que la thyroxine est capable de régénérer le cortex des surrénales énuclées du rat à doses massives (200 et 500 µg.). La possibilité d'une intervention hypophysaire, par l'intermédiaire de la corticostimuline est émise. L'atrophie des surrénales après thyroïdectomie, la régénération des zones corticales et médullaires après administration de thyroxine est démontrée par H. Evans, M. Simpson et R. Pencharz [3]. Pour eux, la présence de l'hypophyse est essentielle, les hormones somatotrope et thyroïdiennes exerçant un action périphérique synergique. Des conclusions identiques sont apportées par R. Scow, M. Simpson, C. Asling, Choh Hao Li et H. Evans en 1949 [4]. Entre temps, B. Lowenstein et R. Zwemer ont confirmé l'augmentation de poids des surrénales de rats normaux après administration de poudre de thyroïde [5]. Des études morphologiques et histologiques sont systématiquement entreprises par H. Deane et R. Greep [6], par J. Feldman [7] et H. Tuchmann-Duplessis [8]. Leurs résultats sont analogues. L'hypothyroïdisme produit une diminution du poids et de la taille des capsules surrénales. Les zones réticulées et fasciculées sont réduites, alors que la glomérulée semble peu affectée. Fait significatif, la thyroïdectomie entraîne une augmentation des inclusions soudanophiles et des corps biréfringents. Tous ces phénomènes regressent sous l'influence du traitement thyroxinien. On pourrait encore citer les travaux de M. Maqsood chez le lapin [9]. Ceux de W. L. Money font apparaître une complète identité de vue avec les précédents [10]. Ces faits sont suffisamment démonstratifs. A n'en pas douter, l'intégrité de la thyroïde est nécessaire tant au développement qu'au fonctionnement des surrénales. A quelques exceptions près,

les auteurs cités reconnaissent une participation hypophysaire, puisque la thyroxine se montre incapable de susciter un accroissement pondéral des surrénales d'animaux thyroïdectomisés et hypophysectomisés. Tels sont les résultats de ce que nous serions tentés d'appeler la période préliminaire de l'étude des interrelations thyroïde-surrénale.

Celle-ci allait se préciser à la suite des découvertes de Szent-Gyorgi concernant la richesse du cortex surrénalien en acide ascorbique et les travaux de M. Sayers et G. Sayers proposant le dosage de ce corps comme test de l'activité de cette glande. De nouvelles perspectives s'ouvrent alors aux chercheurs intéressés par les interférences de la thyroïde et de la surrénale et plus précisément de sa partie corticale. Les techniques histologiques avaient déjà convaincu H. Deane et R. Greep, J. Feldman puis H. Tuchmann-Duplessis des modifications du cortex. Toutefois la diminution du taux de l'ascorbie surrénalienne étant généralement interprétée comme un signe d'activité, son augmentation comme l'effet inverse, l'état fonctionnel des surrénales peut ainsi être aisément évalué. B. Sure et R. Theis dès 1939 [11], puis D. Wallach et E. Reinecke, dix ans plus tard [12], inaugurèrent ce test dans l'étude des rapports thyro-corticosurrénaliens. Les derniers cités constatèrent que l'injection quotidienne de thyroxine, à une dose à vrai dire importante, provoque pendant le premier jour une déplétion ascorbique. Celle-ci disparait après une semaine environ du traitement. Le taux de l'acide ascorbique redevient progressivement normal puis passe par un maximum après quatre semaines d'injections. Ce phénomène, apparemment paradoxal, est néanmoins concevable en supposant que l'hyper-fonctionnement des surrénales détermine en retour une inhibition de la corticostimuline. On retrouvera dans un article de M. Kimura, les mêmes constatations [13]. Une étude systématique des variations de l'ascorbie surrénalienne a été entreprise par P. Timiras et D. Woodbury [14]. Une injection unique de 100 ou 200 µg. de thyroxine chez un rat de 200 g environ cause un abaissement de 10 à 15 p. 100 de l'acide ascorbique. Il en est de même après administration de 20 à 40 µg. de 3.5.3' triiodothyronine. Ce fléchissement présente cette particularité d'être très rapide puisqu'il intervient dix minutes après l'injection. Il s'annule après trente ou cent-vingt minutes suivant la posologie adoptée. Avec les faibles doses, le retour au taux normal est suivi d'une augmentation de l'ascorbie. Douze jours après administration quotidienne de 10 à 40 µg. de 3.5.3'.5'

tétraiodothyronine ou de 2 à 8 µg. de 3.5.3' triiodothyronine, le poids des surrénales s'accroît respectivement de 10, 30, 15 et 35 p. 100 par rapport aux témoins. Ces résultats présentent un intérêt tout particulier, si l'on admet une relation de cause à effet entre les variations de l'acide ascorbique et celles des corticostéroïdes.

La connaissance des relations thyro-corticosurrénaliennes s'enrichit ainsi peu à peu. Des progrès sont patiemment enregistrés qui restreignent les limites du problème.

Il était logique que l'on tente un jour d'évaluer les variations des stéroïdes surrénaliens. D'autant que dans ce domaine des travaux importants ont « mis à jour » les principaux corticostéroïdes sanguins. Sous l'impulsion de G. Pincus et de A. Zaffaroni la chromatographie sur papier des stéroïdes prend naissance, s'affirme, se vulgarise. Elle s'impose comme la technique de choix pour séparer et identifier ces hormones dont le taux plasmatique ne s'élève pas au-delà de quelques microgrammes. Des techniques de dosages suffisamment précises et sélectives sont proposées. Elles allaient orienter l'étude des intéractions thyroïde-corticosurrénales dans une voie inédite. Leur utilisation a permis à K. Eik-Nes et K. Brizzee de mesurer les variations du taux des corticostéroïdes du plasma de chien thyroïdectomisé et traité par la L-thyroxine [15]. Chez cet animal, l'ablation des thyroïdes provoque un effondrement caractéristique des 17-hydroxycorticostéroïdes. La L-thyroxine administrée par voie intra-veineuse à la dose de 0,6 mg pendant sept jours consécutifs rétablit la sécrétion hormonale.

J. Raynaud de son côté, note une augmentation substantielle des 17-hydroxycorticostéroïdes chez la souris traitée par 40 µg de thyroxine [16 et 17].

Les dosages des corticostéroïdes apportent un élément nouveau, tout en confirmant les expériences précédentes. Ils dissipent tout doute sur l'intervention des iodothyronines dans le métabolisme de la corticosurrénale.

Ainsi les variations pondérales des surrénales, les modifications histologiques de leur partie corticale, les mesures de l'acide ascorbique et des 17-hydroxycorticostéroïdes semblent indiquer une participation thyroïdienne aux mécanismes biochimiques de la stéroïdogénèse. Il était donc souhaitable de préciser les effets de la thyroïdectomie et de l'administration d'iodothyronines au niveau du cortex surrénalien dont le rôle essentiel réside dans l'élaboration des corticostéroïdes. Sur ce point les propriétés des hormones thyroïdiennes demeurent

obscures. Elles peuvent s'exercer directement au niveau du cortex, soit en intervenant dans les processus de la biogénèse des stéroïdes, soit en favorisant leur libération. On peut, en outre, envisager l'hypothèse d'une action hypophysaire. Elle fut fréquemment émise sans recevoir de confirmation définitive. La question des rapports thyroïde-corticosurrénale méritait donc d'être reprise et approfondie. Elle est d'importance puisqu'elle peut conduire, en définitive, à une meilleure compréhension du rôle des hormones thyroïdiennes.

Telles ont été, dans leur ensemble, les préoccupations qui ont présidé à nos recherches sur les rapports thyro-corticosurrénaliens.

OBJET DU TRAVAIL.

Nous nous sommes proposés d'étudier les relations thyro-corticosurrénales. Les modifications pondérales des surrénales, les variations de l'ascorbie surrénalienne après thyroïdectomie ou traitement par les hormones thyroïdiennes, montrent en effet que l'intégrité de la thyroïde paraît indispensable à l'activité de la corticosurrénale. Nous avons repris ce problème en nous attachant tout spécialement à suivre les évolutions de la corticoïdogénèse. Les corticostéroïdes représentant les éléments essentiels de la sécrétion du cortex surrénal, l'étude des rapports thyro-corticosurrénaliens devaient, à notre avis, nécessairement en tenir compte. C'est pourquoi, délaissant les méthodes d'appréciation indirecte, de l'activité surrénalienne, nos recherches ont porté principalement sur les variations de ces éléments hormonaux. Pour réaliser un tel projet, il était nécessaire de connaître ceux-ci dans toute la mesure du possible, chez l'animal d'expérience choisi, l'existence de variations interspécifiques dans la sécrétion corticale ayant été démontrée chez certains animaux. Nous avons été ainsi amenés à étudier la sécrétion des corticostéroïdes du rat afin de suivre avec plus de précision les effets de la thyroïdectomie ou de l'administration des hormones thyroïdiennes. Ce travail devait, en outre, nécessairement aborder le problème du mode d'intervention des iodothyronines dans la corticoïdogénèse.

Nos recherches ont comporté trois parties :

I. — *Etude de la sécrétion in vitro des corticostéroïdes par les surrénales du rat.*

II. — *Etude de l'activité corticosurrénalienne du rat thyroïdectomisé et traité par les hormones thyroïdiennes.*

III. — *Recherches sur le mode d'intervention des hormones thyroïdiennes dans la corticoïdogénèse.*

CHAPITRE I.

ÉTUDE DE LA SÉCRÉTION *IN VITRO* DES CORTICOSTÉROÏDES PAR LES SURRÉNALES DU RAT.

INTRODUCTION.

Les dosages de l'ascorbie surrénalienne et des stéroïdes sanguins apportent des renseignements limités aux seuls états d'hyper ou d'hypofonctionnement de la glande. De plus, l'évaluation du taux des stéroïdes est très délicate en raison de leur faible taux dans le plasma (10 à 20 µg/100 ml) et de la composition chimique complexé de ce dernier. Il en va autrement des surrénales. Celles-ci sont capables de sécréter un certain nombre de stéroïdes en quantité suffisante pour se prêter à des dosages convenables. Il était, par conséquent, préférable d'utiliser les glandes elles-mêmes. Notre dessein étant, d'ailleurs, de rechercher le rôle éventuel des hormones thyroïdiennes dans la biogénèse des corticostéroïdes, il convenait d'étudier celle-ci dans des conditions satisfaisantes. Une double nécessité s'imposait donc : d'une part, travailler sur les surrénales isolées, d'autre part, identifier dans la mesure du possible les principaux stéroïdes libérés.

Les techniques d'incubation de coupes d'organes et de tissus dans des milieux artificiels, ont été largement diffusées. Elles ont fourni dans les domaines les plus divers des résultats indéniables. Il était donc légitime d'envisager un tel procédé pour l'étude de l'activité de la corticosurrénale du rat.

Des travaux antérieurs nous ont, d'ailleurs, permis d'orienter nos recherches dans cette voie. M. Saffran, B. Grad et M. Bayliss avaient, en effet, observé dès 1952 que des coupes de surrénales maintenues en survie étaient capables d'augmenter leur sécrétion de stéroïdes après addition d'hormone cortico-

trope [18]. Cette constatation fut aussitôt exploitée par M. Saffran et M. Bayliss [19] puis M. Saffran et A. Schally [20] qui proposèrent une méthode d'étalonnage des préparations commerciales de corticostimuline. Leurs travaux eurent le mérite de montrer que les surrénales incubées conservent non seulement la faculté de sécréter leurs hormones mais encore d'en accroître le taux en présence de la stimuline hypophysaire. Les résultats obtenus montraient clairement tout le profit que l'on pouvait tirer de cette technique. Nous nous en sommes inspirés pour l'étude *in vitro* de l'activité des corticosurrénales, en nous attachant exclusivement aux éléments essentiels de leur sécrétion, c'est-à-dire les stéroïdes hormonaux.

La séparation et l'identification de ceux-ci s'imposaient à des titres divers. Elles s'avéraient, tout d'abord, indispensables pour vérifier la validité de la méthode d'incubation *in vitro* des coupes de surrénales. En outre, des études sur la biochimie des surrénales ne peuvent être valablement entreprises que dans la mesure où les principaux corticostéroïdes sont connus. Etant donné, leur nombre et la diversité de leur structure chimique qui conditionne, en fait, leurs propriétés biologiques, il était nécessaire de les inventorier. Nous nous sommes proposé de définir la nature des principaux corticostéroïdes libérés *in vitro* et d'évaluer leurs proportions respectives.

Ces recherches étaient d'autant plus nécessaires que les conclusions des travaux antérieurs étaient parfois imprécises, souvent contradictoires. Une certaine confusion s'en dégageait quant à la structure des stéroïdes libérés *in vitro* chez le rat. C'est ainsi que R. Heard et ses collaborateurs ont isolé du milieu d'incubation de tissu surrénalien du rat divers corticostéroïdes dont la cortisone, la 17-hydroxycorticostérone, la 11-désoxy, 17-hydroxycorticostérone et divers corps inconnus [21]. L'analyse des stéroïdes présents dans la veine surrénale du rat avait permis à I. E. Bush en 1953 d'isoler la corticostérone, dans quelques cas, la 11-déhydrocorticostérone et des traces d'un troisième composé, vraisemblablement la 11-hydroxy, androstène-4, 3-17-dione [22]. Pour F. Elliott et A. Schally la corticostérone et la 17-hydroxycorticostérone représentent les principaux produits de la sécrétion *in vitro* des surrénales du rat [23] alors que F. Hofmann et C. Davison extraient un certain nombre de stéroïdes inconnus et la corticostérone [24]. La découverte de l'aldostérone en 1953 devait

nécessairement aboutir à la recherche de cette importante hormone minéralotrope chez le rat. B. Singer et M. Stack-Dunne se chargèrent de la dépister dans le sang veineux de la surrénale de cet animal en reprenant les méthodes d'extraction et de séparation utilisées par I. Bush [25]. La détection de l'aldostérone fut effectuée par des essais biologiques, basés sur les variations du ^{24}Na et du ^{42}K urinaires selon la procédure de S. Simpson et S. Tait [26]. Les stéroïdes furent isolés par chromatographie sur papier, élués et les éluats injectés à l'animal après concentration. On retrouve la même préoccupation chez C. Giroud et ses collaborateurs, qui isolent du milieu d'incubation de surrénales du rat, un minéralo-corticoïde dont les propriétés biologiques semblent identiques à celles de la 18-oxo-corticostérone [27]. Par contre, les conclusions de A. Ghilain, J. Lafontaine et de J. Schwers sont diamétralement opposées, puisqu'elles nient la présence de l'aldostérone. Selon ces auteurs, la sécrétion *in vitro* de la surrénale du rat est représentée par la 17-hydroxycorticostérone, la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone, et la Δ_4-Androstène, 3, 17-dione [28].

Mise à part, la corticostérone, dont la présence ne semble contestée par personne, la nature des autres stéroïdes libérés par les surrénales du rat varie selon les auteurs. Il nous a donc paru nécessaire de préciser la sécrétion surrénalienne du rat avant d'entreprendre nos recherches sur les interrelations thyro-surrénaliennes.

I. — ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES CORTICOSTÉROÏDES LIBÉRÉS *IN VITRO* PAR LES SURRÉNALES DU RAT.

A. — Technique d'incubation *in vitro* des surrénales du Rat.

Les surrénales sont prélevées sur l'animal anesthésié par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (5 mg/100 g poids corporel). Elles sont rapidement débarrassées des tissus et des graisses périphériques. Chaque paire, nettoyée, est immédiatement pesée au moyen d'une balance monoplateau. Elle est ensuite placée en atmosphère humide dans une boîte de Pétri renfermant du liquide de Krebs maintenu à 37°C. Quatre à huit paires de surrénales sont utilisées suivant les expériences. Chacune d'elles est coupée en huit quartiers.

Deux paires de glandes, soit seize fragments, sont introduits dans chaque fiole d'incubation renfermant 3 ml de liquide de Krebs.

(Chlorure de sodium 7 g, Chlorure de potassium 0,35 g Chlorure de calcium 0,28 g, Chlorure de magnésium 0,30 Bicarbonate de sodium 2,10 g, Phosphate disodique 0,16 g Glucose 2,0, Eau q.s.p. 1000 ml).

L'appareil à incubation que nous avons réalisé est extrêmement simple (fig. 1).

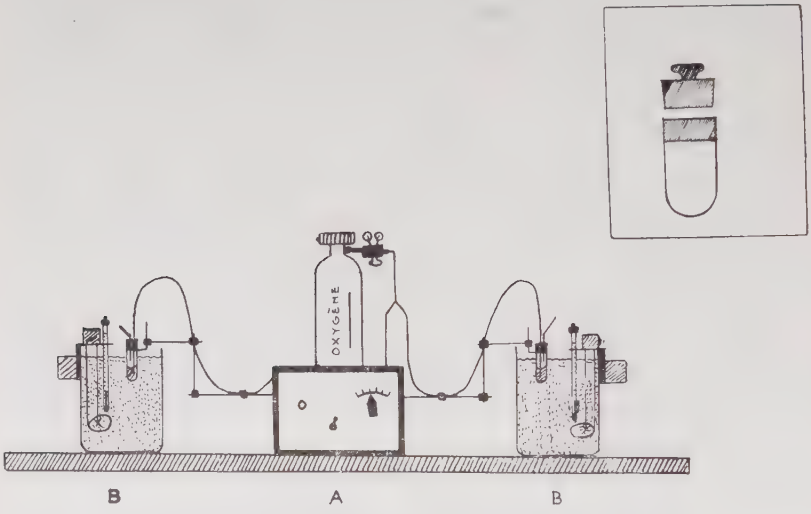


Fig. 1. — Schéma de l'appareil utilisé pour l'incubation des coupes de surrénales.

A. — Agitateur mécanique.

B. Bacs à eau.

En médaillon : représentation schématique d'une fiole d'incubation.

Il comprend essentiellement deux bacs à eau cylindriques, en verre pyrex, d'une capacité de cinq litres environ. Sur chacun d'eux est disposé d'un thermostat du type Rotax, assurant la constance de la température (37°C) et un brassage permanent de l'eau. Les fioles d'incubation proprement dites sont montées sur un agitateur et maintenues sur les bras de ce dernier au moyen de pinces métalliques. Deux flasks sont fixés sur chaque bac. Un circuit d'oxygène alimente les fioles individuellement grâce à un système de pinces permettant de régler à volonté les quantités d'O_2. Les fioles ont été spécialement fabriquées. Réalisées en verre pyrex, avec rodage norma-

lisé, elles ont une capacité de 10 ml environ, une hauteur de 7 cm et un diamètre de 2 cm (Fig. 1). Elles permettent d'effectuer les diverses opérations — incubations, extractions, centrifugations — évitant ainsi les transvasements successifs et par conséquent les pertes.

La durée des incubations n'excède pas 3 heures. Les corticostéroïdes libérés au cours de cette période sont ensuite extraits après élimination des coupes de surrénales. Les extractions sont effectuées par addition de 3 ml de chloroforme (Merck) à chaque fiole, et agitation manuelle de 5 minutes. Les émulsions sont brisées par centrifugation et la phase organique est prélevée par siphonnage. L'opération est renouvelée une seconde fois avec 3 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques sont évaporées jusqu'à siccité sous pression réduite à la température du laboratoire au moyen d'un évaporateur rotatif et dans des tubes à essai de dimensions réduites (130 mm × 13 mm). La distillation dans ceux-ci présente l'avantage de faciliter la reprise de l'extrait sec dans le cas où une chromatographie est envisagée, ou d'y effectuer directement le dosage. Les pertes sont ainsi réduites au minimum ce qui est appréciable en raison des faibles quantités de substances à évaluer.

Des vérifications effectuées avec des quantités déterminées de 17-hydroxycorticostérone et de 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone (10 et 20 µg) en solution dans l'alcool méthylique et ajoutées au liquide de Krebs ont été systématiquement entreprises. Elles nous ont permis de constater que la récupération des stéroïdes par le chloroforme est quantitative.

B. — Isolement et caractérisation des stéroïdes sécrétés *in vitro* par les surrénales du rat.

1. — Chromatographie des corticostéroïdes.

Des surrénales de rats mâles prélevées comme nous l'avons indiqué précédemment ont été incubées à 37° sous oxygène et agitation continue pendant 3 heures. Deux paires de surrénales coupées en 16 quartiers ont été placées dans chaque fiole d'incubation renfermant 3 ml de liquide de Krebs. Les stéroïdes ont été extraits par 6 ml de chloroforme (Merck) en deux fois. Les solutions chloroformiques ont été ensuite évaporées à siccité sous pression réduite, et le résidu d'évapora-

tion soigneusement repris par 0,4 ml de chloroforme avant d'être déposé sur le chromatogramme.

Des essais préliminaires ont été nécessaires pour évaluer la proportion optima de surrénales permettant de détecter aisément les principaux corticostéroïdes. Elle a été fixée à quatre paires de surrénales de rats adultes par expérience représentant un poids d'environ 120 mg.

Les corticostéroïdes ont été séparés sur papier Whatman n° 1 à 30° C, par chromatographie descendante dans le système de solvants, benzène, méthanol, eau (100:50:50) [29]. Diverses raisons nous ont amenés à l'utiliser bien que de nombreux solvants aient été proposés pour la séparation des C_{19} et C_{21} stéroïdes. Les techniques les plus couramment utilisées sont de deux types. Les unes utilisent des papiers préalablement imprégnés d'un solvant organique non volatil. La phase fixe est alors constituée soit par du propylène glycol, soit par de la formamide et la phase mobile par du chloroforme, du benzène ou du toluène. A. Zaffaroni et ses collaborateurs ont préconisé les systèmes de solvants : benzène-formamide, toluène-propylène glycol [30] et chloroforme-formamide [31] pour la séparation des corticostéroïdes. Les autres emploient des papiers non traités et des solvants volatils pour les deux phases. La phase stationnaire est constituée le plus souvent d'un mélange méthanol-eau et la phase mobile par du benzène, du toluène ou de l'éther de pétrole. I. E. Bush a décrit plusieurs systèmes de solvants permettant l'identification des corticostéroïdes surrénaliens [29].

Les papiers préalablement traités présentent certains inconvénients. L'imprégnation par la formamide ou le propylène glycol ne permet pas de suivre les mouvements de la phase mobile. Le front du solvant étant invisible, le calcul des Rf des substances séparées ne peut être effectué. L'emploi de colorants comme indicateurs de front ou la détermination du Rt (Rt = $\frac{\text{mvt stéroïde inconnu}}{\text{mvt stéroïde témoin}}$) peuvent dans une certaine mesure éliminer ces difficultés. Le degré d'imprégnation du papier intervient en outre sur la migration des stéroïdes. La reproductibilité des résultats exige donc une standardisation maxima de la méthode d'imbibition du papier. Toutefois le motif qui nous a conduit, après divers essais, à éliminer ce genre de chromatographie tient à la nature de la phase fixe. L'élution des stéroïdes par les solvants organiques entraînent, en effet, la formamide ou le propylène glycol dont l'élimination des éluats

sur lesquels est effectué le dosage des hormones présente certaines difficultés. En outre, le mélange chloroforme-formamide ne permet pas de séparer l'aldostérone et la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone.

C'est pourquoi nous avons préféré les systèmes de solvants établis par I. E. Bush [29]. Les mélanges toluène-méthanol-eau (40.30.10) ou benzène-méthanol-eau (100.50.50) assurent d'excellentes séparations des principales hormones corticales connues c'est-à-dire de la 17-hydroxycorticostérone, de la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone, de la corticostérone, de la 11-déhydrocorticostérone, et de la 11-désoxycorticostérone. Dans le premier la diffusion des stéroïdes est plus marquée que dans le second. Après révélation, les spots sont plus étalés et par conséquent la résolution est moins fine. Nous avons fait la même constatation avec le système toluène, acétate d'éthyle-méthanol-eau (90.10.50.50) au sein duquel la séparation de l'aldostérone et de la 17-hydroxycorticostérone n'est d'ailleurs pas possible.

Les expériences initiales auxquelles nous nous sommes livrés, nous ont donc conduits à l'adoption définitive du système de solvants : benzène-méthanol-eau (100.50.50) utilisé en chromatographie descendante à 30°C avec le papier Whatman n° 1. Il fournit une différenciation satisfaisante des corticostéroïdes libérés par les surrénales du rat. La rapidité de la migration de la phase mobile (10 cm/heure environ) lui confère, en outre, un intérêt pratique certain.

2. — Révélation des stéroïdes.

Quelques substances sont utilisées pour la révélation des stéroïdes. Certaines d'entre elles réagissent avec une spécificité suffisante pour mettre en évidence tel ou tel groupement caractéristique de ceux-ci. Nous avons fait largement appel à ces indicateurs pour identifier les fonctions typiques des corticostéroïdes telles que Δ_4-3 cétonique et α-cétolique en C_{17}.

— La 2-4 dinitrophénylhydrazine en solution chlorhydrique à 1,50 % permet de révéler les stéroïdes 3, 17 et 20 cétoniques (2.4 DNPH) [32] (fig. 2).

— La pulvérisation sur les chromatogrammes d'une solution aqueuse de soude à 10 % suivie d'un chauffage à 80° C provoque une fluorescence jaune visible aux U.V. avec les Δ_4-3 cétostéroïdes [33] (fig. 2).

— Les chaînes latérales α-cétoliques et dihydroxyacétoniques situées en C_{17}, correspondant respectivement aux groupements 20-céto, 21 hydroxylé et 20-céto, 17, 21-hydroxylés, sont aisément décelables en raison de leurs propriétés réductrices. Les solutions alcalines de chlorure de triphényltétrazolium à 0,2 % (T.P.T.Z.) [39] ou de bleu de tétrazolium à 0,1 % (BT) [35] donnent la première une coloration rose, la seconde des spots bleu-violets (fig. 2). L'utilisation du bleu de tétrazolium est préférable en raison de sa plus grande sensibilité. Ces deux réactifs étant préparés en milieu sodique, ils ont l'avantage de révéler en même temps les groupements Δ_4-3 cétoniques, après chauffage des chromatogrammes à 80°C et examen en lumière de Wood.

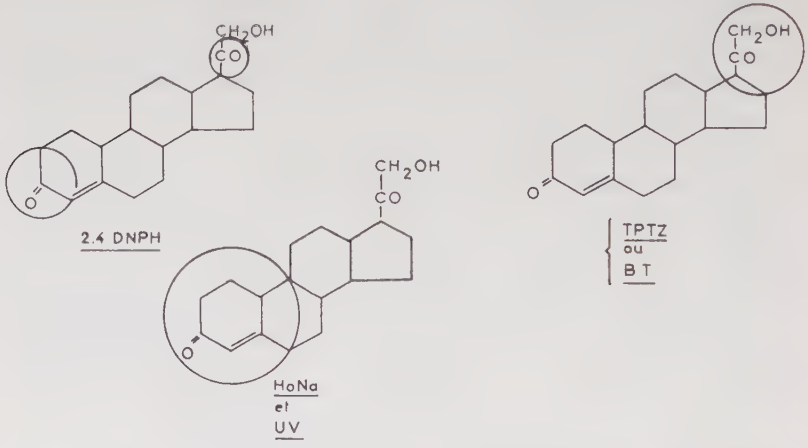


Fig. 2. — Principaux groupements réactionnels des corticostéroïdes.

3. — Absorption des stéroïdes dans l'U.V.

Les stéroïdes Δ_4-3 cétoniques présentent cette particularité d'absorber les radiations ultra-violettes dans la région spectrale située vers 240 mμ. Partant de cette propriété, W. Haines et N. Drake ont mis au point un système ingénieux permettant de repérer les stéroïdes sur les chromatogrammes, sans faire appel à des réactifs chimiques [36 et 37]. Cette technique de détection est basée sur l'absorption par les stéroïdes de la fluorescence émise par un filtre spécial à base de silicate de zinc et de phosphore excité par une radiation lumineuse de 253 mμ.

Dans l'impossibilité d'obtenir un tel filtre, nous avons tenté de mesurer l'absorption des stéroïdes à 253 mμ en adaptant au densitomètre Photovolt, le photomultiplicateur à 9 étages et le microampèremètre extrêmement sensible du fluorescimètre Photovolt. Les résultats ont été très satisfaisants et nous reproduisons sur la figure 3 les courbes d'absorption d'un mélange de stéroïdes de référence séparés par chromatographie sur papier dans le mélange benzène-méthanol-eau. La sensibilité de l'appareil est telle qu'elle permet de déceler moins de 5 μg de stéroïde. Ce procédé est précieux car il permet non seulement de calculer les proportions relatives des différents stéroïdes isolés, mais encore de procéder à leur élution en l'absence de substance de référence.

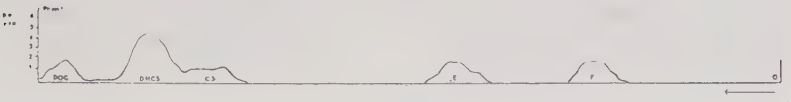


Fig. 3. — Courbe d'absorption à 253 mμ d'un mélange de corticostéroïdes séparés par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 dans le système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100.50.50) à 30°C.
F = 17-hydroxycorticostérone — E = 11 déhydro, 17-hydroxycorticostérone.
CS = Corticostérone — DH.CS = 11-déhydrocorticostérone.
DOC = 11-désoxycorticostérone.

4. — Identification des corticostéroïdes.

Les surrénales du rat incubées *in vitro*, secrètent un certain nombre de stéroïdes dont six au moins ont pu être isolés et décelés par les méthodes de chromatographie et de révélation décrites précédemment.

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau I.

Un certain nombre de chromatogrammes ont été révélés par les divers réactifs, pour mettre en évidence les groupements caractéristiques des stéroïdes (Tableau II). Tous présentent la configuration des Δ_4-3 cétostéroïdes.

Seul le composé X_3 ne présente pas de chaîne réductrice α-cétolique, tandis que le stéroïde X_2 réduit le bleu de tétrazolium à chaud.

On peut tenir pour certaine la présence de la corticostérone, de la 11-déhydrocorticostérone et de l'aldostérone. Trois autres stéroïdes, X_1, X_2, X_3 ont été retrouvés sur les chromatogrammes, mais leur nature demeure inconnue (fig. 4).

TABLEAU I.

Rf des corticostéroïdes libérés in vitro *par les surrénales du rat.*

Système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100.50.50).

Chromatographie descendante — Papier Whatman n° 1, t° = 30°C.

Stéroïdes témoins	Rf. ±0,02	Stéroïdes surrénaliens	Rf. ±0,02
17-hydroxycorticostérone..	0,27	Stéroïde X_1	0,08
11-déhydro, 17-hydroxy-corticostérone.....	0,47	Stéroïde X_2	0,15
Corticostérone.....	0,76	Aldostérone	0,38
11-désoxy, 17-hydroxycor-ticostérone.....	0,77	Stéroïde X_3	0,66
11-déhydrocorticostérone..	0,81	Corticostérone	0,76
11-désoxycorticostérone...	0,95	11-déhydrocorti-costérone	0,81
Δ 4-androstène-3-one, 11-01	0,89		
Δ4-androstène 3-11-17-trione	0,90		
Δ4-androstène 3-one-17-01 .	0,92		
17-hydroxyprogestérone...	0,92		

TABLEAU II.

Réactions des stéroïdes surrénaliens vis-à-vis des divers réactifs utilisés.

Stéroïdes	Rf.	Triphenyl tétrazo-lium	Bleu de tétra-zolium	HO Na à 10 % U. V.	Phénylhy-drazine à 0,150 %
X_1.....	0,08	±	±	+	+
X_2.....	0,15	+	+	+	+
Aldostérone.....	0,38	+	+	+	+
X_3.....	0,66	0	0	+	+
Corticostérone.....	0,76	+	+	+	+
11-déhydrocorticos-térone	0,81	+	+	+	+

Si la caractérisation de la corticostérone et de la 11-déhydrocorticostérone a été facile, celle de l'aldostérone a été plus délicate. La présence d'un stéroïde de Rf. = 0,38, par conséquent situé entre la 17-hydroxycorticostérone et la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone témoins, nous avait amené à supposer qu'il pouvait s'agir de l'hormone minéralotrope. La vérification de cette hypothèse n'était pas facile en l'absence d'aldostérone cristallisée utilisable comme substance de référence.

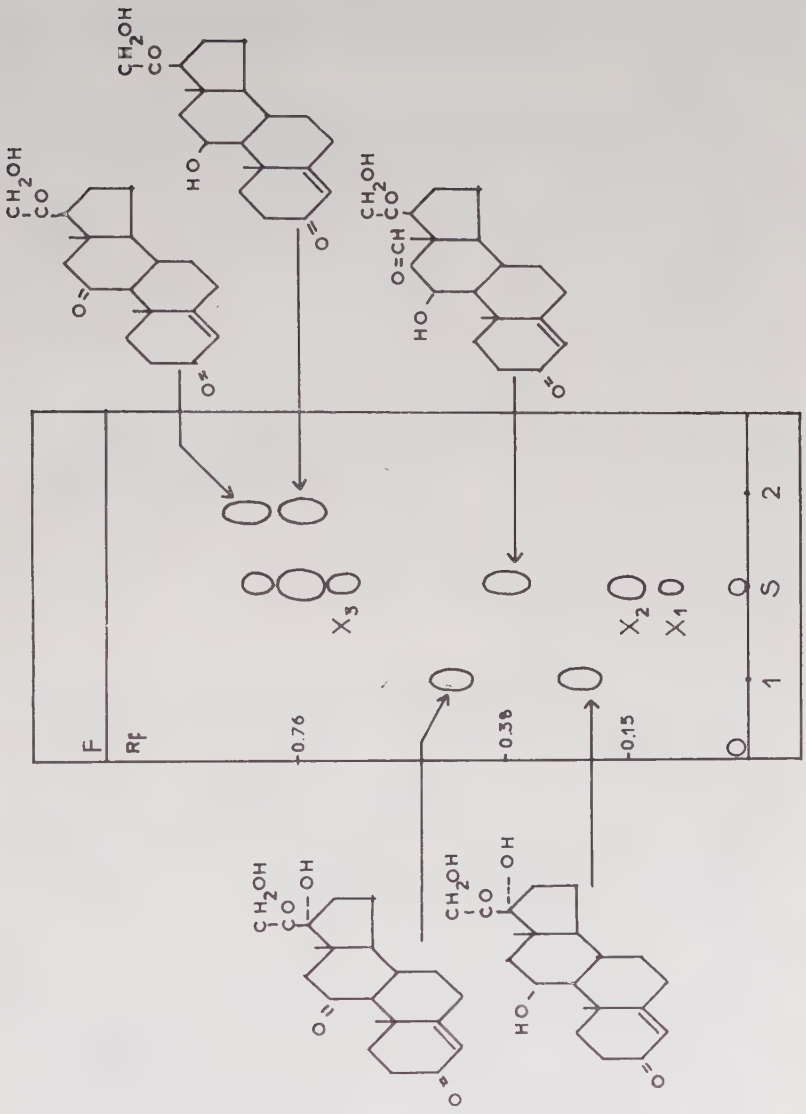


Fig. 4. — Chromatogramme des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rats normaux (S).
Solvant : Benzène-Méthanol-Eau (100-50-50).

O = Origine du chromatogramme.
F = Front du solvant.
1 = 17-hydroxycorticostérone et 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone témoins.
S = Corticostéroïdes surrénaliens du rat.
2 = Corticostérone et 11-déhydrocorticostérone témoins.

Nous avons donc tout d'abord utilisé la méthode de R. Neher et A. Wettstein qui permet de l'identifier sans recourir à un étalon [38].

Les surrénales de 16 rats ont été incubées dans du liquide de Krebs. Les stéroïdes sécrétés ont été séparés par chromatographie préparative dans le système benzène-méthanol-eau (100.50.50) en même temps que les stéroïdes de référence suivants : 17-hydroxycorticostérone et 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone. La révélation de ceux-ci dont les Rf = 0,27 et 0,47 sont proches de celui de l'aldostérone (Rf = 0,38) permet de repérer avec exactitude la zone de cette dernière. L'aldostérone a été éluée par un mélange de chloroforme et de méthanol (1 : 1 V/V). Les éluats concentrés ont été divisés en deux parts. L'une a été chromatographiée sur papier Whatman n° 1 imprégné de formamide dans le chloroforme saturé de formamide [31] l'autre dans le mélange toluène, acétate d'éthyle, méthanol-eau (90.10.50.50) [29]. Dans le premier solvant, l'aldostérone migre presque aussi loin que la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone, dans le second, son Rf = 0,42 est pratiquement identique à celui de la 17-hydroxycorticostérone (Rf = 0,39) (fig. 5).

Une seconde expérimentation effectuée dans les mêmes conditions à partir de 16 surrénales allaient confirmer ces résultats. La présence de l'aldostérone pouvait donc être considérée comme définitivement démontrée. L'obtention, par la suite, de 50 µg d'aldostérone cristallisée et l'étude de sa migration dans le solvant benzène-méthanol-eau ne laisse subsister aucun doute sur la nature du corticostéroïde de Rf. = 0,38 (1).

Les stéroïdes X_1 et X_2 présentent dans le mélange benzène-méthanol-eau, une polarité plus grande que celle de l'aldostérone. Le premier n'existe qu'en très faible quantité. Il n'est donc pas aisé de l'identifier. Le stéroïde X_2 possède les caractéristiques d'un Δ_4-3 cétostéroïde. De tous les corticostéroïdes isolés, c'est lui qui possède la plus forte fluorescence en lumière de Wood. Il réduit le bleu de tétrazolium faiblement à froid, la coloration apparaissant nettement à chaud vers 60-70° C. Il y a donc lieu de penser que la molécule renferme un groupement α-cétolique en C_{17}. Si la coloration bleue est plus intense à chaud qu'à froid, cela tient vraisemblablement à la teneur relativement peu élevée de ce stéroïde. Nous avons,

(1) Nous remercions vivement les laboratoires CIBA de Bâle qui nous ont offert 0,05 mg d'aldostérone cristallisée.

en effet, remarqué que les colorations au bleu de tétrazolium étaient amplifiées après séchage des chromatogrammes à 60-70° C.

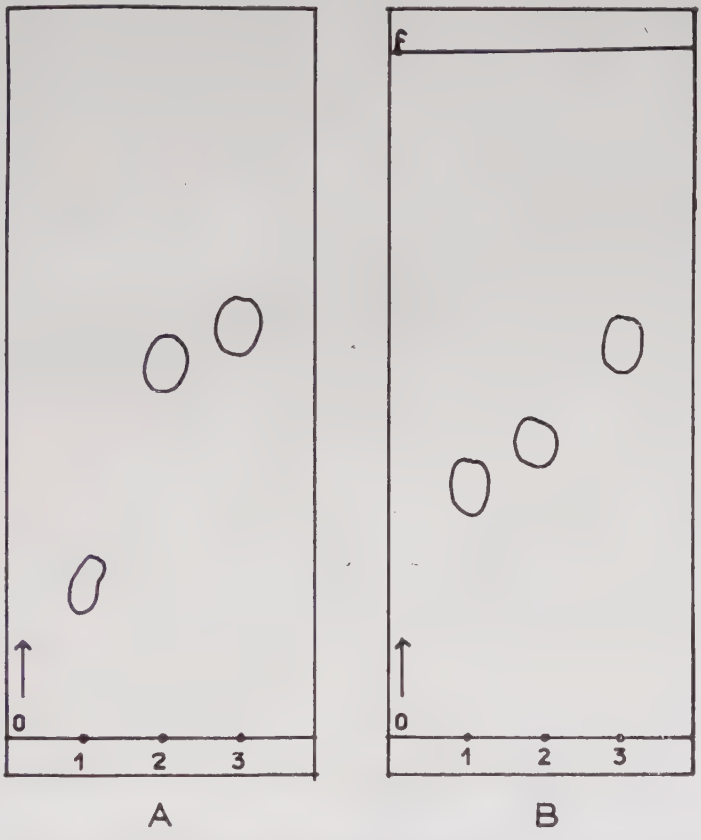


Fig. 5. — Identification chromatographique de l'aldostérone libérée par les surrénales du rat.

A) Chromatographie dans le chloroforme saturé de formamide.

1) 17-hydroxycorticostérone ; 2) Aldostérone éluée ; 3) 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone.

B) Chromatographie dans le mélange : Toluène, Acétate d'éthyle, Méthanol, eau (90.10.50.50).

1) 17-hydroxycorticostérone, 2) Aldostérone éluée, 3) 11-déhydro. 17-hydroxycorticostérone.

I. Bush a signalé la présence de stéroïdes inconnus présentant des Rf. identiques aux corps X_1 et X_2 dans le système de solvants benzène-méthanol-eau (100.50.50) [29]. Ils ont été séparés par cet auteur à partir d'extraits de surrénales de rat,

et représentent selon lui les fractions amorphes. Th. Rahandraha et A. Rakoto Ratsimamanga ont eux-mêmes obtenu des stéroïdes de structure inconnue à partir de fractions amorphes provenant d'extraits de surrénales de porc et de bœuf [39]. Ceux-ci possèdent une polarité plus grande que la 17-hydroxycorticostérone. On peut penser que ces substances fortement polaires ont une structure chimique similaire aux stéroïdes X_1 et X_2. Deux stéroïdes ayant les mêmes mobilités que ces derniers dans le mélange benzène-méthanol-eau ont été isolés des urines humaines par Ch. Gray [40]. Il s'agit de la Δ_4-Prégnène, 17-20-21 triol, 3-11-dione, et de la Δ_4-Prégnène, 11-17-20-21 tétrol, 3-one. Bien qu'effectuée sur les produits de sécrétion de 24 paires de surrénales, la mise en évidence des groupements 17-20-diols et 17-20-21 triols suivant les méthodes de I. Bush [41] s'est révélée négative. A vrai dire cela ne saurait surprendre car les substances détectées par Ch. Gray doivent être considérées comme des catabolites hormonaux, plutôt que des hormones vraies.

La structure exacte du stéroïde X_2 demeure donc inconnue. Toutefois nous avons été frappé par la similitude du comportement chromatographique de ce dernier avec la 19-hydroxy-11-désoxycorticostérone. Elle a été isolée par M. Hayano et R. Dorfman à partir d'homogénats de surrénales de bœufs incubés en présence de 11-désoxycorticostérone [42] et par H. Levy et St. Kushinsky dans le perfusat de glandes isolées de bœuf après administration de progestérone [43]. Bien que le système de solvants utilisés par ces auteurs fut le toluène-propylène glycol, la 19-hydroxy-11-désoxycorticostérone présente une mobilité égale au tiers de la corticostérone, soit approximativement la même que le composé X_2 dans le mélange benzène-méthanol-eau. On peut donc raisonnablement envisager pour X_2 une structure identique au corps décrit par Hayano et Levy. A moins qu'il ne s'agisse de la 19-hydroxy-corticostérone. Il ne semble pas qu'un tel composé ait jamais été isolé. Son identification nécessiterait de longues et minutieuses recherches. Elle dépasse le cadre de nos recherches mais une telle possibilité mérite d'être envisagée.

La similitude des Rf. de la corticostérone et de la 11-désoxy, 17-hydroxycorticostérone dans le système de solvants benzène-méthanol-eau pouvait laisser planer un doute sur la présence de l'un ou l'autre de ces stéroïdes. La chromatographie des corticostéroïdes libérés dans le mélange toluène-acétate d'éthyle, méthanol-eau à 40° C (90. 10. 50. 50) [29] nous a permis

d'éliminer la présence de la 11-désoxy-17-hydroxycorticostérone.

Quant au stéroïde X_3 dont le Rf. est situé entre ceux de l'aldostérone et de la corticostérone, il est caractérisé par l'absence de groupement cétolique en C_{17}. Il s'agit d'un Δ_4-3-cétostéroïde non réducteur.

Ajoutons, en outre, que nous n'avons jamais pu mettre en évidence de facon certaine, la présence de 11-désoxycorticostérone ou de Δ_4-androstène-11-β ol, 3-17 dione.

Enfin, une des caractéristiques essentielles de la biogénèse des corticostéroïdes chez le rat, réside dans l'absence de sécrétion de 17-hydroxycorticostérone et de 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone. Elle doit être soulignée, car elle représente un trait essentiel de la corticoïdogénèse chez cet animal. F. Hofmann [44] G. Pincus [45] de même que C. Mialhe-Voloss et E. Beaulieu [46] l'ont signalée. Elle est imputable sinon à un défaut de 17-hydroxylase, du moins à un taux extrêmement bas de cet enzyme.

II. — ÉVALUATION DU TAUX DES CORTICOSTÉROIDES SECRÉTÉS *IN VITRO* PAR LES SURRÉNALES DU RAT.

Les recherches précédentes ont permis d'isoler et de caractériser en partie les principaux corticostéroïdes libérés *in vitro* par les surrénales du rat. Elles étaient nécessaires pour suivre ultérieurement les variations respectives des divers stéroïdes après thyroïdectomie ou administration d'iodothyronines.

Cette première étape devait tout naturellement conduire à l'évaluation quantitative des stéroïdes totaux et individuels. La connaissance de leurs principales caractéristiques était d'ailleurs indispensable pour adopter une méthode de dosage judicieuse. La plus couramment utilisée apprécie le groupe des 17-21 dihydroxy-20-cétostéroïdes. Proposée par C. Porter et R. Silber, elle est considérée comme spécifique des 17-hydroxycorticostéroïdes [47]. La réduction du bleu de tétrazolium par la chaine α-cétolique en C_{17}, est à la base de la technique de W. Mader et R. Buck dont l'utilisation se trouve de ce fait limitée à la détermination des 20-céto, 21-hydroxystéroïdes [48]. Ni l'une, ni l'autre ne convenait par conséquent

au dosage des stéroïdes sécrétés chez le rat. L'absence de composés 17-hydroxylés, la présence de dérivés Δ_4-3 cétoniques dont certains seulement présentent une chaîne latérale réductrice, nous a conduit à préférer la méthode plus générale de A. Gornall et M. Mac Donald [49]. La 2-4 dinitrophénylhydrazine en solution chlorhydrique réagit à chaud (59° C) en 90 minutes avec les fonctions cétones en position 3. 20. et même 11. Après refroidissement la neutralisation par la soude

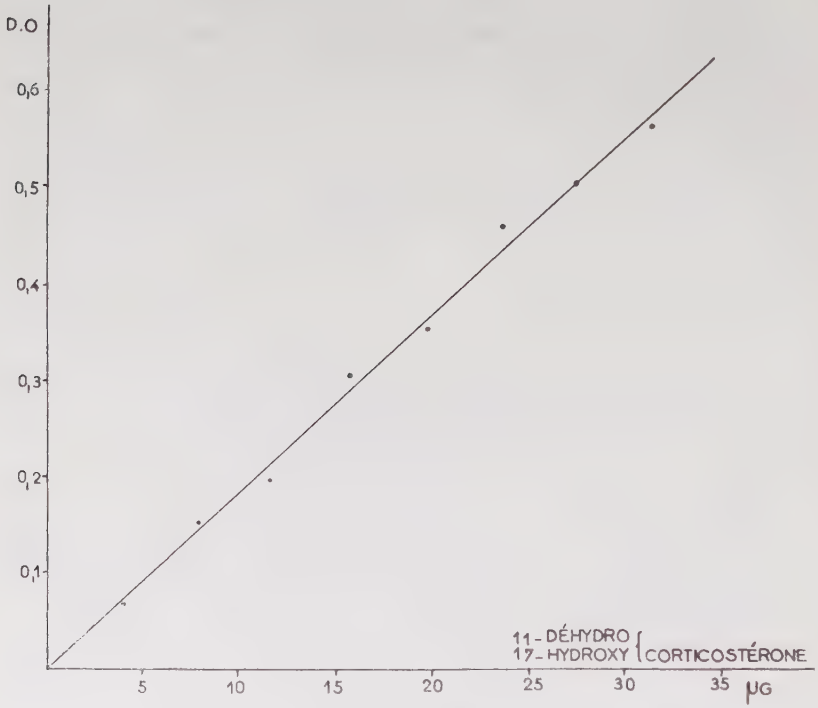


Fig. 6. — Courbe d'étalonnage de la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone. Dosage A. Gornall et M. Mac Donald. Lecture à 475 mµ.

4 N. produit une coloration rouge dont l'intensité est appréciée au spectrophotomètre à 475 mµ. Les courbes d'étalonnage sont effectuées avec la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone en solution dans le méthanol. Nous reproduisons sur la figure 6 une courbe de référence. La sensibilité de cette technique permet de doser 1 à 30 µg de stéroïde suivant la sensibilité du photomètre et le volume final de la solution colorée.

1. — Taux des stéroïdes globaux secrétés par les surrénales du rat.

Après divers essais préliminaires nous avons fixé à quatre le nombre optimum de paires de surrénales nécessaires pour effectuer un dosage convenable de corticostéroïdes.

Les surrénales coupées en quartiers sont mises à incuber à 37° C pendant 3 heures. Les corticostéroïdes sont extraits par 3 ml de chloroforme Merck. L'opération est répétée une seconde fois. Les émulsions sont brisées par une brève centrifugation et les solutions chloroformiques siphonnées sont évaporées à sec sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif dans de petits tubes à essais. Il est indispensable de prendre de grandes précautions lors du prélèvement de la couche chloroformique pour éviter d'entraîner des traces de liquide de Krebs dont le glucose réagissant avec la 2-4 dinitrophénylhydrazine fausse les résultats. Les extraits chloroformiques sont suffisamment purifiés et il n'est point besoin de recourir à des fractionnements ultérieurs. Les corticostéroïdes sont dosés suivant la technique de A. Gornall et M. Mac Donald. Nous reproduisons dans le tableau III les taux des stéroïdes sécrétés en 3 heures par différents lots de surrénales de rats mâles. Le taux moyen des corticostéroïdes libérés

TABLEAU III.

Taux des corticostéroïdes sécrétés en 3 heures par les surrénales de rats mâles.

Nombre de paires de surrénales	Poids des surrénales en mg	Taux des corticostéroïdes en γg	Taux des corticostéroïdes exprimés en γg 1 g de surrénales
2	46	8	174
2	49	8	163
4	103	18	174
4	96	17	177
4	117	17	145
4	68	11	161
4	93	12	129
4	88	12	136
4	120	19	158
4	114	20	175
4	114	19	166
4	124	22	177
4	128	22	171

en 3 heures d'incubation est de 161 µg. Il est inférieur à ceux fournis par d'autres auteurs.

F. Hofmann et C. Davison ont trouvé un taux d'excrétion de 7 µg/100 mg de surrénales et par heure [24], tandis que M. Saffran et M. Bayliss [19] ont obtenu des chiffres moyens de 6,7 µg/100 mg et par heure. Il est vrai que les techniques de dosage adoptées par ces auteurs étaient différentes de la nôtre, comme l'étaient les solvants utilisés pour l'extraction des stéroïdes et nous avons déjà signalé les précautions qu'il convient d'apporter au prélèvement des liquides organiques pour éviter l'interférence du glucose au cours du dosage.

2. — Taux des différents stéroïdes secrétés par les surrénales du rat.

Les recherches entreprises nous ont permis d'isoler un certain nombre de corticostéroïdes de structure chimique différente. Il convenait par conséquent d'évaluer le taux de chacun d'entre eux afin de suivre leurs variations au cours de nos travaux ultérieurs.

Huit paires de surrénales sont nécessaires pour doser convenablement les différentes hormones. Elles sont placées en incubation pendant 3 h à 37° C sous oxygène et agitation permanente, dans 4 fioles renfermant chacune 3 ml de liquide de Krebs. Les extraits chloroformiques renfermant les produits de la sécrétion des surrénales sont réunis et évaporés sous vide par petites portions dans un tube à essai. Le résidu sec est repris deux fois par 0,2 ml de chloroforme que l'on dépose sur une feuille de papier Whatman n° 1 de 12 cm × 42 cm préalablement lavée à l'alcool absolu, en même temps que les substances de référence suivantes : 17-hydroxycorticostérone, 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone, corticostérone et 11-déhydrocorticostérone. La chromatographie est effectuée à 30° C dans le système de solvants benzène-méthanol-eau (100. 50. 50). Après révélation des stéroïdes-témoins, le chromatogramme est découpé en quatre zones :

— la zone 1 (Rf. = 0.00 à 0,20) correspondant aux stéroïdes X_1 et X_2 ;

— la zone 2 (Rf. = 0,30-0,40) à l'aldostérone ;

— la zone 3 (Rf. = 0,60-0,75) au stéroïde X_3 et à la corticostérone ;

la zone 4 (Rf. = 0,75-0,85) à la 11-déhydrocorticostérone.

Les bandelettes sont placées entre deux lames de microscope et éluées pendant 48 heures par de l'éthanol absolu traité à la paraphénylénediamine et redistillé. Les éluats sont évaporés à sec sous pression réduite, et les stéroïdes dosés suivant la méthode de A. Gornall et M. Mac Donald. Les taux des différents corticostéroïdes libérés en 3 h sont réunis dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

Quantité des divers corticostéroïdes libérés in vitro en 3 heures par les surrénales du rat.

Stéroïdes dosés	Taux des stéroïdes µg/1 g de surrénales				Taux moyen
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	
Stéroïdes $X_1 + X_2$	39	21	35	27	30
Aldostérone	42	47	46	40	43
Stéroïde X_3 + corticostérone	51	53	43	44	47
11-déhydrocorticostérone	16	26	35	22	24
	148 µg	147 µg	159 µg	133 µg	147 µg

Ces dosages nous ont permis de connaître les quantités respectives des différents stéroïdes sécrétés par la corticosurrénale du rat sur laquelle nous ne possédions que des renseignements très fragmentaires. Seules la corticostérone et l'aldostérone ont fait l'objet de déterminations quantitatives limitées. La première représente 80 p. 100 de la sécrétion totale pour les uns [23], 45 à 50 p. 100 pour les autres [27]. Ces taux paraissent anormalement élevés. Ils sont dus en partie au fait que ces auteurs ont utilisé des solvants chromatographiques ne permettant pas de séparer les stéroïdes X_3, la corticostérone et la 11-déhydrocorticostérone. Ceux-ci ont donc été dosés ensemble. L'évaluation de l'aldostérone a été effectuée par C. Giroud et ses collaborateurs [27]. Utilisant une méthode de dosage biologique (injection d'aldostérone à des animaux hypophysectomisés et dosage du ^{24}Na et ^{42}K urinaires) ils ont trouvé une sécrétion moyenne de l'ordre 5 µg pour 1 g de surrénale et par heure. Elle est par conséquent inférieure à celle que nous avons observée.

L'ignorance de la structure exacte des stéroïdes X_1, X_2 et X_3 et l'impossibilité d'utiliser des substances de référence, nous ont contraints de doser les deux premiers simultanément,

le troisième avec la corticostérone. Il n'était pas sans intérêt d'obtenir une meilleure répartition des taux des différents stéroïdes. Pour ce faire, quatre lots de huit paires de surrénales chacun ont été incubés à 37° C, sous oxygène pendant 3 heures. Les corticostéroïdes ont été séparés par chromatographie descendante dans le système de solvants benzène-méthanol-eau. Les chromatogrammes ont été ensuite examinés mm par mm à 253 mμ au moyen du densitomètre Photovolt et les courbes d'absorption des corticostéroïdes ont été établies pour permettre le calcul planimétrique des pourcentages relatifs des différents stéroïdes (fig. 7).

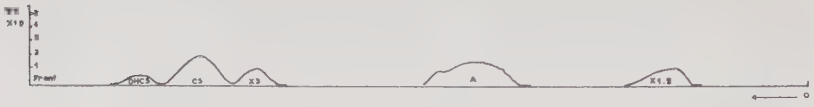


Fig. 7. — Courbe d'absorption à 253 mμ des corticostéroïdes libérés *in vitro* par les surrénales du rat normal, et séparés par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le mélange : Benzène-Méthanol-eau (100.50.50) à 30°C.

X_1—2 = Stéroïdes X_1 + X_2.
A = Aldostérone.
X_3 = Stéroïde X_3.
CS = Corticostérone.
DH—CS = 11-déhydrocorticostérone.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau V.

Les mesures densitométriques nous ont permis de préciser les pourcentages du stéroïde X_3 et de la corticostérone, qu'il n'avait pas été possible d'obtenir par dosage chimique. Malheureusement en l'absence de séparation suffisante des stéroïdes X_1 et X_2, il était illusoire de les doser séparément. Néanmoins on peut dire que dans l'ensemble les résultats sont concordants. La planimétrie des courbes d'absorption dans l'U.V. donne des chiffres plus élevés que ceux obtenus par la technique de A. Gornall et M. Mac Donald sauf en ce qui concerne l'aldostérone et la 11-déhydrocorticostérone. Il est vraisemblable que malgré les précautions prises (lavage des papiers à l'alcool, utilisation d'éthanol redistillé), l'élution entraîne des substances réductrices de nature non hormonale. D'autre part, les Rf. voisins de la corticostérone et de la 11-déhydrocorticostérone ne permettent pas un découpage rigoureux de l'un et l'autre de ces stéroïdes. Il y a donc lieu de penser qu'une faible partie de la corticostérone a été éluée en même temps que la 11-déhydrocorticostérone provoquant ainsi une légère augmentation du taux de cette dernière et par voie de consé-

TABLEAU V.

Pourcentages relatifs des divers corticostéroïdes obtenus par densitométrie dans l'U.V. et par dosage chimique.

Stéroïdes dosés	Densitomètre U.V.				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	% moyen
$X_1 + X_2$	36	27	32	22	*29*
Aldostérone	25	22	16	23	*21*
X_3	13	15	13	18	15
	} 34	} 37	} 37	} 50	} 39
Corticostérone	21	22	24	32	25
11-déhydrocorticostérone	4	13	14	4	*9*

Stéroïdes dosés	Dosage 2, 4-dinitrophénylhydrazine				
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	% moyen
$X_1 + X_2$	26	14	22	20	*20*
Aldostérone	28	31	29	30	*29*
X_3	} 34	36	27	33	*32*
Corticostérone					
11-déhydrocorticostérone	10	17	22	16	*16*

quence, une diminution de la première. En tenant compte de ces hypothèses, les résultats obtenus par ces deux techniques sont concordants.

III. — DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

Les recherches entreprises sur la sécrétion des corticostéroïdes par les surrénales du rat nous ont permis de préciser un certain nombre de faits. Elles étaient nécessaires non seulement pour connaître le nombre et la nature des principaux corticostéroïdes, mais encore pour évaluer leurs taux respectifs.

Les stéroïdes sécrétés sont au nombre de six. Tous possèdent la configuration Δ_4-3 cétonique, et quelques-uns d'entre eux, une chaîne réductrice α-cétolique en C_{17}. La corticostérone, la 11-déhydrocorticostérone et l'aldostérone ont pu être identifiées avec certitude. La structure des trois autres demeure inconnue.

A vrai dire la présence de la corticostérone dans les liquides d'incubation ou le sang veineux de la surrénale du rat n'était contestée par personne. Celle de la 11-déhydrocorticostérone a donné lieu à plusieurs controverses. Affirmée par les uns, niée par les autres, sa détection est délicate en raison de son Rf, extrêmement voisin, sinon identique à celui de la corticostérone dans la plupart des systèmes de solvants. Il n'est donc pas étonnant qu'elle soit passée inaperçue pour beaucoup et confondue avec son homologue 11-hydroxylé. Il en va autrement avec le mélange benzène-méthanol-eau (100.50.50).

La détection du stéroïde X_3 est sujette aux mêmes erreurs. Placé à proximité de la corticostérone, son identification peut prêter à confusion. Nous l'avons constamment retrouvé sur nos chromatogrammes et la densitométrie de ceux-ci dans l'U.V. ne laisse subsister aucun doute (fig. 7).

Nous avons, en outre, souligné la présence de l'aldostérone. L'importance de cette hormone méritait qu'on s'attache à sa caractérisation. Qu'elle ait échappé à beaucoup s'explique aisément. Sa découverte est trop récente pour que l'on ait songé à la rechercher. En outre, elle se comporte tantôt comme la 17-hydroxycorticostérone, tantôt comme la 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone dans nombre de systèmes de solvants utilisés pour la séparation des corticostéroïdes. Ceci explique que l'aldostérone fut parfois identifiée à l'une ou l'autre de ces hormones. L'absence de ces deux 17-hydroxycorticostéroïdes et le Rf. différent de l'aldostérone dans le solvant que nous avons utilisé nous a évidemment simplifié la tâche.

Reste le cas des stéroïdes X_1, X_2 et X_3.

Le dernier est un Δ_4-3 cétostéroïde dont la chaîne latérale en C_{17} ne présente pas de caractère réducteur. Son identification à des stéroïdes de référence de structure connue est demeurée vaine.

Le stéroïde X_2 possède une forte polarité. Il s'agit d'un Δ_4-3 cétostéroïde, ayant la plus forte fluorescence en lumière de Wood, et réduisant le bleu de tétrazolium à chaud. Bien que nous ne puissions certifier sa structure, il est tout de même possible d'envisager son identité probable. Etant donné son Rf. et ses caractères analytiques, il n'est pas impossible que nous soyons en présence de 19-hydroxycorticostérone.

Quant au stéroïde X_1, Δ_4-3 cétostéroïde, ses faibles proportions rendent son identification malaisée.

Les principales caractéristiques de la sécrétion corticosurrénalienne du rat ne se bornent pas là. Nous avons déjà dit

qu'elles étaient complétées par l'absence de 17-hydroxycorticostéroïdes et de 17-cétostéroïdes. Il s'agit là d'un phénomène particulier intéressant à noter du point de vue de la biochimie comparée.

A ce travail de prospection devait tout naturellement succéder le dosage global et individuel des stéroïdes. Nous avons pu évaluer leurs taux respectifs. Ils sont dans l'ensemble à peu près identiques. Seule la 11-déhydrocorticostérone est sécrétée à un taux relativement bas. Ces déterminations nous ont permis de rétablir à de plus justes proportions les valeurs de la corticostérone et de l'aldostérone.

Grâce à ces recherches initiales, la corticostéroïdogenèse chez le rat se trouve précisée. Il était indispensable de les entreprendre pour juger ultérieurement les effets de la thyroïdectomie ou des hormones thyroïdiennes. Il n'était pas possible, en effet, d'envisager l'étude des relations thyro-corticosurrénaliennes sans définir au préalable l'essentiel de l'activité hormonale de la corticosurrénale.

CHAPITRE II.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ CORTICOSURRÉNALIENNE DU RAT THYROIDECTOMISÉ ET TRAITÉ PAR LES HORMONES THYROÏDIENNES.

INTRODUCTION.

L'année 1910 marque le point de départ des études concernant les rapports thyroïde-surrénales. Le mérite en revient à R. Hoskins qui le premier constata l'hypertrophie des surrénales de cobayes après administration de poudre de thyroïde [1]. Un certain nombre de travaux allaient par la suite confirmer cette observation et préciser les relations existant entre les glandes thyroïde et surrénales. Les plus anciens d'entre eux, réalisés à une époque où la biochimie hormonale n'en était qu'à ses débuts, font état d'une atrophie des surrénales après thyroïdectomie, et d'une hypertrophie après administration d'extraits thyroïdiens ou de thyroxine [1 à 10].

Ils démontraient clairement que l'intégrité de la thyroïde est indispensable au développement des surrénales. Des précisions furent apportées par H. Evans, M. Simpson et R. Pencharz [3], par H. Deane et R. Greep [6], par F. Feldman [7] et par H. Tuchmann-Duplessis [8] au cours d'études histologiques. Elles indiquaient que les parties médullaire et corticale des surrénales étaient simultanément affectées. Les zones réticulées et fasciculées du cortex sont réduites après ablation de la thyroïde et l'augmentation des inclusions soudanophiles et des corps biréfringents souligne l'état hypofonctionnel de la corticosurrénale.

L'évaluation de l'acide ascorbique surrénalien devait permettre une analyse plus rigoureuse des rapports thyro-corticosurrénaliens. Szent-Gyorgii ayant établi la richesse des surré-

nales en acide ascorbique et son intervention dans la biogénèse des stéroïdes ayant été démontrée, M. Sayers et G. Sayers proposèrent son dosage comme test de l'activité de ces glandes. En fait, il existe un parallélisme étroit entre les variations de l'ascorbie surrénalienne et celles des corticostéroïdes. L'hyperfonctionnement des surrénales produit une déplétion en acide ascorbique, alors que l'augmentation du taux de ce dernier traduit un ralentissement de leur activité.

B. Surf et R. Theis, dès 1939, constatèrent une diminution de l'acide ascorbique des surrénales après administration de thyroxine [11]. Ces premières expériences furent confirmées dix ans plus tard par D. Wallach et E. Reineke [12]. Ces auteurs ont obtenu une baisse significative de l'ascorbie surrénalienne après administration de 20 µg de dl-thyroxine/100 g de poids, pendant quatre jours. La prolongation du traitement provoque ensuite une augmentation progressive du poids des surrénales et de leur teneur en acide ascorbique. Les conclusions de M. Kimura [13], celles de P. Timiras et D. Woodbury [14] sont identiques. L'injection quotidienne de préparations thyroïdiennes, de thyroxine ou de 3.5.3'-triiodothyronine produit d'abord un abaissement du taux de l'acide ascorbique. Il s'annule ensuite et son élévation ultérieure va de pair avec l'hypertrophie des surrénales. Ces recherches sont significatives de l'intervention des iodothyronines dans le métabolisme de la corticosurrénale.

Les dosages des stéroïdes sanguins complèteront ces résultats. Ils furent effectués par K. Eik-Nes et K. Brizzee chez le chien thyroïdectomisé [15]. L'ablation des thyroïdes provoque chez cet animal un effondrement du taux des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques. L'administration intraveineuse de 0,6 mg de l-thyroxine pendant 7 jours consécutifs permet sa restauration. L'augmentation des 17-hydroxycorticostéroïdes a également été constatée par J. Raynaud après injection de 40 µg de thyroxine à des souris [16-17]. Bien que les expériences de ce genre ne soient pas nombreuses elles n'offrent pas moins un élément nouveau et intéressant dans l'étude des rapports thyro-corticosurrénaliens.

Les travaux que nous venons de citer concordent dans l'ensemble. Qu'ils fassent état des variations pondérales des surrénales, des modifications de l'acide ascorbique ou des stéroïdes sanguins, ils indiquent clairement que l'intégrité de la thyroïde est nécessaire au fonctionnement normal de la cor-

ticosurrénale. Tel était l'état de la question lorsque nous avons entrepris nos recherches.

Il faut remarquer que l'étude des interactions thyroïde-surrénales n'a été abordée jusqu'ici que par des moyens indirects. Il convenait, par conséquent, de la reprendre pour en préciser les différents aspects. Les fonctions du cortex surrénalien sont capitales. Organe essentiel à la vie, il intervient dans les échanges tissulaires les plus variés. Il règle le volume sanguin, assure la répartition de l'eau et des sels minéraux entre les différents secteurs hydriques de l'organisme, régissant ainsi l'équilibre du milieu intérieur et du cytoplasma.. La difficulté de maintenir en survie les animaux surrénalectomisés suffit à elle seule à démontrer son caractère indispensable. Ses propriétés sont inhérentes aux différents stéroïdes dont il assure la formation sous le contrôle de la corticostimuline. Son rôle princeps réside donc dans la corticoïdogénèse. L'étude des relations unissant les glandes thyroïde et corticosurrénales devait nécessairement en tenir compte. Seule l'exploration rigoureuse de celles-ci, pouvait conduire à des résultats précis et définitifs. La mesure des variations des corticostéroïdes sécrétés par la glande elle-même, l'évaluation de leur étendue s'avéraient indispensables pour connaître les effets de la thyroïdectomie et juger le rôle éventuel des iodothyronines dans la stéroïdogénèse. La réalisation d'un tel projet exigeait une étude approfondie de la sécrétion corticale afin de préciser le nombre et la nature des corticostéroïdes. Les travaux entrepris nous ont permis d'acquérir sur ce sujet des connaissances suffisantes. Ils levaient les derniers obstacles à l'examen des rapports thyro-corticosurrénaliens.

La mise en évidence des propriétés inhibitrices de la 2-méthyl-1, 2-bis (3-pyridyl)-1-propanone vis-à-vis de la sécrétion du cortex surrénal, nous a engagés à utiliser cette substance. La corticoïdogénèse très particulière du rat nous en a fourni l'occasion. Nous pensions, en outre, pouvoir tirer de ces expériences un certain nombre de conclusions utiles pour l'interprétation des résultats obtenus chez le rat thyroïdectomisé. En comparant les effets de cet inhibiteur, à ceux de la thyroïdectomie, nous espérions dégager des renseignements susceptibles de nous éclairer sur le mode d'intervention des iodothyronines dans la biogénèse des corticostéroïdes.

Nos recherches ont donc revêtu un double aspect. Nous nous sommes d'abord attachés à l'étude de l'activité corticosurréna-

lienne du rat thyroïdectomisé et traité par la thyroxine ou la 3.5.3'-triiodothyronine. Nous avons ensuite exploré les propriétés de la diméthyl-dipyridyl-propanone. Il était souhaitable d'envisager une telle confrontation pour connaître le rôle éventuel des iodothyronines dans la corticoïdogénèse.

I. — MODIFICATIONS PONDÉRALES SURRÉNALIENNES CONSTATÉES CHEZ LE RAT THYROIDECTOMISÉ ET TRAITÉ PAR LES IODOTHYRONINES.

Bien que les variations de poids des surrénales du rat thyroïdectomisé et traité par la thyroxine (T_4) aient été largement démontrées, il nous a semblé intéressant de savoir si l'on peut établir une relation entre celles-ci et l'activité hormonale de ces glandes. De plus, peu d'expériences ont été effectuées soit avec la L.3.5.3' triiodothyronine (L-T_3) dont l'activité est 5 à 10 fois plus grande que son homologue tétraiodé, soit avec l'acide 3.5.3' triiodothyroacétique (T A_3) produit du métabolisme tissulaire de l'hormone triiodée. Il était donc intéressant de comparer l'activité de ces substances.

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles radiothyroïdectomisés depuis 3 semaines, et traités par des doses variables de L-T_4, L-T_3 ou T A_3. Etant donné le nombre d'animaux utilisés simultanément, nous avons préféré la radiothyroïdectomie à l'ablation chirurgicale des thyroïdes. Préconisée et mise au point par R. Goldberg et L. Chaikoff [**50**], la destruction de ces glandes par ^{131}I est totale et présente de nombreux avantages. Elle permet de thyroïdectomiser rapidement un nombre important d'animaux. Les parathyroïdes demeurent intactes et comme l'ont souligné ses promoteurs, l'injection du radioisotope ne produit pas de modifications histologiques autres que celles imputables à l'absence de thyroïde [**51**].

Nos animaux pesant entre 60 et 80 g ont été radiothyroïdectomisés par injection intrapéritonéale de 300 à 400 µc d'^{131}I en solution dans le sérum physiologique.

Trois semaines après l'injection, les animaux ont été pesés ainsi que leurs surrénales. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau VI.

Ces résultats ne font que confirmer les conclusions des travaux précédents, la radiothyroïdectomie provoque une atrophie des surrénales et une diminution du poids corporel.

TABLEAU VI.

Poids corporel des animaux thyroïdectomisés normaux et de leurs surrénales (moyenne des poids calculée à partir de lots de 8 rats).

Lot N°	Rats thyroïdectomisés		Rats normaux-témoins	
	Poids corporel en g.	Poids des surrénales en mg/paire	Poids corporel en g.	Poids des surrénales en mg/paire
Lot 1	79	23	104	26
Lot 2	76	20	127	27
Lot 3	96	30	103	34
Lot 4	104	22	130	30
Lot 5	99	19	108	25
Lot 6	113	20	155	27
Lot 7	116	21	128	27
Lot 8	117	20	130	31
Lot 9	123	20	135	27

Des lots de huits rats radiothyroïdectomisés depuis 3 semaines ont été traités soit par L-T_4, L-T_3 ou TA_3 à des doses variées et pendant des périodes plus ou moins longues. Les substances iodées ont été injectées par voie intra-péritonéale. A la fin du traitement les animaux ont été sacrifiés et les surrénales ont été immédiatement prélevées et pesées. Le tableau VII rend compte des résultats.

Comme en témoignent les résultats, les doses physiologiques de L-T_3 (0,6 µg) ne provoquent qu'une augmentation limitée du poids des surrénales. Il en est de même après injection de TA_3 aux doses de 5 et 10 µg. Le poids des surrénales des animaux traités demeure inférieur à celui des mêmes glandes des rats normaux. Par contre la L-T_4 et la L-T_3 administrées aux doses respectives de 5 µg, 2 et 2,5 µg modifient le poids des surrénales. La première le restaure tandis que la seconde détermine une légère hypertrophie. Ces constatations sont en accord avec ce que l'on connaît de l'activité de ces deux hormones. Certes les variations pondérales observées sont minimes, comparées à celles obtenues par d'autres auteurs qui rapportent des augmentations variant de 30 à 120 % [8, 12]. Il est vrai que les doses de T_4 administrées (20 à 80 µg/100 g) par ceux-ci étaient considérables en sorte qu'on peut se demander si l'hypertrophie surrénalienne n'était pas secondaire à une véritable intoxication. Nos résultats concordent avec ceux de P. Timiras et D. Woodbury qui ont obtenu des variations pondérales voi-

TABLEAU VII.

Poids corporel des animaux traités et de leurs surrénales (moyenne des poids obtenus à partir de lots de 8 rats).

Lot n°	Substance injectée	Durée du traitement	Poids corporel en g	Poids des surrénales mg/paire
Lot 1	L-T_3 0,6 µg.	15 jours	98	30
	TA_3 5 µg.	d°	90	31
	Témoins normaux		106	35
Lot 2	L-T_4 5 µg.	15 jours	106	30
	L-T_3 2 µg.	d°	79	38
	TA_3 10 µg.	d°	113	24
	Témoins normaux		156	32
Lot 3	L-T_4 5 µg.	30 jours	147	31
	L-T_3 2,5 µg.	d°	153	31
	Témoins normaux		155	27
Lot 4	L-T_4 5 µg.	30 jours	200	26
	L-T_3 2,5 µg.	d°	167	30
	Témoins normaux		162	26
Lot 5	L-T_4 5 µg.	40 jours	178	29
	L-T_3 2,5 µg.	d°	193	36
	Témoins normaux		181	33

sines des nôtres après injections prolongées de L-T_4 et L-T_3 à des doses identiques à celles que nous avons utilisées [14].

II. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA CORTICOSURRÉNALE DU RAT THYROIDECTOMISÉ ET TRAITÉ PAR LES HORMONES THYROIDIENNES.

Le rôle essentiel de la corticosurrénale étant la synthèse et la libération des corticostéroïdes, le problème des relations thyro-corticosurrénaliennes devait être abordé quant au fond. Seule l'étude de la corticoïdogénèse peut fournir sur ce sujet des renseignements précis. Les recherches précédentes nous ayant permis de constater la pluralité des corticostéroïdes surrénaliens, il convenait de connaître leurs variations respectives tant chez le rat thyroïdectomisé que l'animal traité par les hormones thyroïdiennes. La diversité de leur structure engendre des propriétés biologiques qui confèrent à chacun d'eux une fonction précise. Il importait donc de suivre l'évolution

de chacun d'entre eux, afin de savoir si l'absence de thyroïde et l'administration d'iodothyronines se traduisent par des modifications préférentielles. C'est pourquoi nous nous sommes attachés au dosage individuel des corticostéroïdes plutôt qu'à leurs variations globales.

A. — Sécrétion des corticostéroïdes par les surrénales du rat normal et radiothyroïdectomisé.

Les animaux ont été radiothyroïdectomisés par injection intra-péritonéale d'^{131}I. Trois semaines après, leurs surrénales ont été prélevées, coupées en quartiers et mises à incuber dans du liquide de Krebs à 37° C sous oxygène pendant 3 heures. Huit paires de surrénales ont été utilisées à chaque expérimentation. Les stéroïdes libérés et extraits par le chloroforme ont été séparés par chromatographie descendante à 30°C dans le système de solvants benzène-méthanol-eau (100.50.50). Après découpage du chromatogramme en 4 zones, comme nous l'avons indiqué précédemment, les corticostéroïdes ont été élués par l'éthanol absolu et dosés suivant la technique de A. Gornall et M. Mac Donald. Des lots de huit surrénales de rats normaux ont été traités de façon identique pour servir de témoins. Les taux des stéroïdes libérés par les surrénales de rats thyroïdectomisés et normaux sont réunis dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII.

Taux des différents stéroïdes libérés in vitro en 3 heures par les surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés (exprimés en µg/1 g de surrénales).

Stéroïdes dosés	Rats thyroïdectomisés				Rats normaux		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 1	Lot 2	Lot 3
$X_1 + X_2$	26	16	16	34	40	40	27
Aldostérone	22	21	20	20	42	39	40
X_3 + corticostérone	20	27	30	33	52	44	44
11-déhydrocorticostérone	15	13	14	11	16	21	22
Total	83	77	80	98	150	144	133
Taux moyen	84				142		

Divers enseignements peuvent être tirés de ces résultats. En effet, la thyroïdectomie affecte le fonctionnement des cortico-

surrénales dans ce qu'il a d'essentiel c'est-à-dire la formation des corticostéroïdes. La diminution du taux des stéroïdes sécrétés par les surrénales du rat thyroïdectomisé est d'environ 40 % par rapport à celui des animaux normaux. Elle est générale puisqu'elle atteint tous les stéroïdes sans distinction de

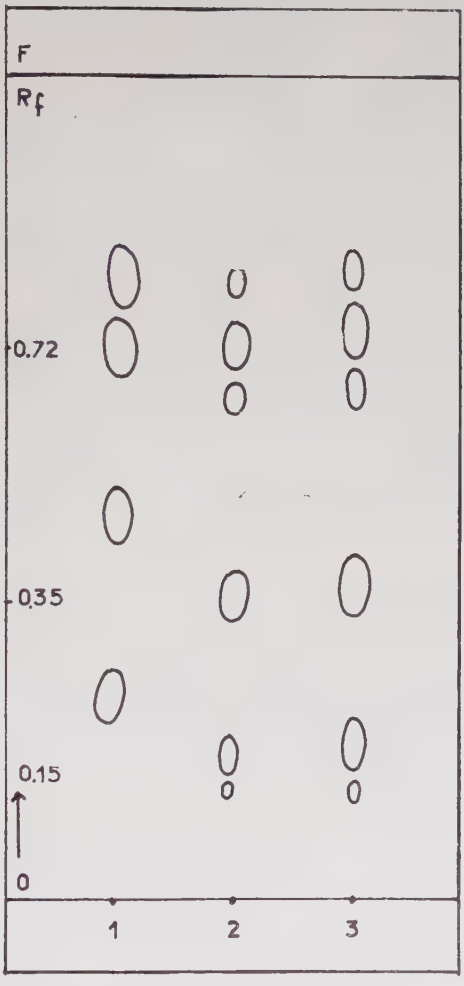


Fig. 8. — *Chromatogramme des corticostéroïdes.*

1) De référence.
2) Libérés *in vitro* par des surrénales de rats thyroïdectomisés
3) Libérés *in vitro* par des surrénales de rats normaux.

Système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100.50.50). T° 30°C. Papier Whatman 1.

structure ou de fonction. La destruction des thyroïdes provoque donc un état d'hypofonctionnement corticosurrénalien caractérisé par un ralentissement de la corticoïdogénèse. Ce phénomène méritait d'être précisé.

La chromatographie des corticostéroïdes provenant des surrénales de rats thyroïdectomisés, nous a permis de confirmer, à diverses reprises cet hypocorticisme (figure 8).

B. — Sécrétion des corticostéroïdes par les surrénales du rat thyroïdectomisé et traité par les hormones thyroïdiennes.

Puisque la thyroïdectomie provoque une diminution de la corticoïdogénèse, on peut penser que l'administration d'iodothyronines réalise l'effet inverse. C'est pourquoi nous avons tenté de mettre en évidence l'action de celles-ci sur la formation des corticostéroïdes.

Des lots de 8 rats radiothyroïdectomisés depuis plus de 3 semaines ont reçu des injections intra-péritonéales quotidiennes d'hormones thyroïdiennes. En voici la répartition :

Lot 1. Injection journalière de 5 µg de TA_3 pendant 15 jours
Lot 2. Injection de 0,6 µg de L-T_3 pendant 15 jours
Lot 3. Injection de 2,5 µg de L-T_3 pendant 30 jours
Lot 4. Injection de 5 µg de L-T_4 pendant 30 jours
Lot 5. Injection de 2,5 µg de L-T_3 pendant 40 jours
Lot 6. Injection de 5 µg de L-T_4 pendant 40 jours

Les surrénales des animaux des lots 1, 2, 3 et 4 ont été incubées pendant 3 heures en présence de liquide de Krebs. Les stéroïdes séparés par chromatographie sur papier dans le système de solvants habituel, ont été élués et dosés par la méthode de A. Gornall et M. Mac Donald.

Les surrénales des rats des lots 5 et 6 ont été utilisées partie pour procéder au dosage total des stéroïdes, partie pour effectuer une chromatographie. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau IX.

L'acide 3.5.3' Triiodothyroacétique et la 3.5.3' Triiodothyronine, injectés aux doses respectives de 5 µg et 0,6 µg sont sans effet sur la corticoïdogénèse. Le taux des corticostéroïdes reste identique à celui des animaux thyroïdectomisés. Il en va de même avec la 3.5.3'5' tétraiodothyronine administrée à la dose de 5 µg pendant 1 mois. Sans doute ces doses sont-elles suffi-

TABLEAU IX.

Evaluation des corticostéroïdes libérés in vitro en 3 heures par les surrénales de rats thyroïdectomisés, traités par les iodothyronines (µg/1 g de surrénale).

Stéroïdes dosés	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6
	TA_3 5 µg 15 jours	$L\text{-}T_3$ 0,6 µg 15 jours	$L\text{-}T_3$ 2,5 µg 30 jours	$L\text{-}T_4$ 5 µg 30 jours	$L\text{-}T_3$ 2,5 µg 40 jours	$L\text{-}T_4$ 5 µg 40 jours
X_1+X_2	19	12	20	16		
Aldostérone	18	30	28	20		
X_3 + corticostérone	19	15	42	30		
11-déhydrocorticostérone	17	10	20	14		
Total	73	67	110	80	122	116

santes pour suppléer au défaut de la sécrétion thyroïdienne endogène, mais incapables de supprimer complètement les conséquences de la thyroïdectomie.

La triiodothyronine à la dose 2,5 µg permet une restauration partielle de la corticoïdogénèse (lots 3 et 5). Elle est intéressante à noter car elle laisse supposer qu'un traitement prolongé, étalé sur plusieurs mois peut réduire l'hypocorticisme de l'animal thyréoprive. Il faut souligner également l'activité particulière de la $L\text{-}T_3$.

Le dosage individuel des stéroïdes ne permet pas d'envisager une action sélective de la $L\text{-}T_3$ sur l'un ou l'autre d'entre eux, sauf en ce qui concerne l'aldostérone, bien qu'elle reste limitée. La chromatographie des stéroïdes provenant des surrénales de lots 5 et 6 et l'examen du chromatogramme après révélation au bleu de tétrazolium et passage aux U.V. ont confirmé ces résultats.

Ainsi les conditions expérimentales adoptées sont inaptes en partie à rétablir la sécrétion normale des corticostéroïdes chez le rat thyroïdectomisé. Faut-il en conclure que les doses d'hormones administrées étaient insuffisantes ? Il existe selon toute vraisemblance une dose limite au-dessous de laquelle les iodothyronines sont sans effet sur les surrénales. Une telle constatation a été faite par P. Timiras et D. Woodbury [14], D. Wallach et E. Reinecke ont de leur côté signalé qu'à la dose de 5 µg la dl-thyroxine est sans action sur le poids des surrénales et l'ascorbie surrénalienne tandis qu'à la dose de 80 µg on perçoit des signes très nets d'hypercorticisme [12].

C. — Etude du métabolisme hydro-minéral du rat normal, thyroïdectomisé et traité par L — T_3 et TA_3.

On connaît le rôle prépondérant des hormones de la corticosurrénale dans le maintien de l'équilibre hydro-minéral de l'organisme. Considéré à juste titre comme le principal minéralocorticoïde, l'aldostérone en est le puissant régulateur. En freinant l'élimination du sodium, en régularisant celle de l'eau, en favorisant celle du potassium au niveau des tubuli rénaux, elle assure la répartition de l'eau et des sels minéraux entre les différents secteurs de l'organisme intra et extra cellulaires.

Les observations précédentes ayant montré de sérieuses modifications de la sécrétion corticosurrénalienne après destruction du corps thyroïde, l'étude du métabolisme hydrominéral des animaux expérimentés présentait un intérêt certain. L'hypocorticisme du rat thyroïdectomisé laissait prévoir des troubles importants qu'il convenait d'évaluer. Nous espérions en même temps acquérir une preuve indirecte de l'action des hormones thyroïdiennes sur la sécrétion des corticostéroïdes.

1. — Elimination urinaire de l'eau et du sodium chez le rat normal, thyroïdectomisé et traité par L-T_3 et TA_3.

Nos recherches ont porté sur des rats mâles pesant environ 80 g et thyroïdectomisés par injection de 400 µc d'^{131}I. Ils ont été placés par lots de quatre dans des cages à métabolisme permettant la récolte des urines. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les animaux ont eu à leur disposition une nourriture standard et de l'eau à volonté. Les urines ont été recueillies chaque jour et leur volume mesuré. Après centrifugation, une partie adéquate a été utilisée, après dilution convenable pour le dosage du sodium par photométrie de flamme.

Des lots de rats normaux ont été constitués et maintenus dans les mêmes conditions.

Les taux moyens de l'élimination rénale quotidienne de l'eau et du sodium sont représentés sur les figures : 9 et 10.

Quinze jours après la radiothyroïdectomie, les animaux ont été divisés en deux lots de huit, chacun réparti en deux groupes de quatre. Ceux du premier lot ont reçu en injection intrapéritonéale 0,5 µg de T_3 ceux du second 5 µg de TA_3. Pendant toute la durée du traitement, soit quinze jours, nous avons

mesuré quotidiennement le volume des urines et déterminé leur teneur en sodium. Les résultats ont été groupés dans les figures 9 et 10.

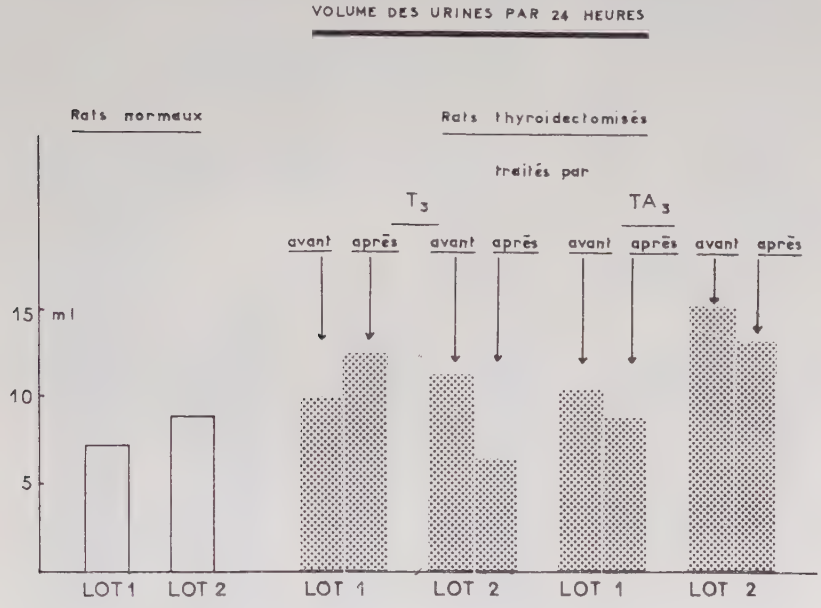


Fig. 9. — Volumes des urines émises par 24 heures par lots de 4 rats : normaux, thyroïdectomisés puis traités par T_3 (0,5 µg) et TA_3 (5 µg).

Les résultats sont significatifs. L'absence de sécrétion thyroïdienne provoque une augmentation de l'excrétion rénale de l'eau et du sodium. Ces troubles sont secondaires à l'hyposécrétion des stéroïdes corticosurrénaux et avant tout de l'aldostérone. Ils sont responsables conjointement avec un ralentissement de la synthèse des protéines tissulaires, de l'amaigrissement des animaux thyroïdectomisés (cf. tableau 6). L'administration journalière de 0,5 µg de L-T_3 et celle de 5 µg de TA_3 pendant quinze jours réduit le déséquilibre hydro-minéral sans toutefois le supprimer. Ceci corrobore les variations des stéroïdes surrénaliens après injection d'hormones thyroïdiennes.

La L-T_3 se montre la plus efficace pour freiner l'élimination urinaire du sodium.

Ainsi, malgré les difficultés d'obtention d'urines rigoureusement exemptes de souillures alimentaires ou fécales, les dosages de la natrurie et la mesure des volumes urinaires con-

firment les variations des corticostéroïdes du rat thyroïdectomisé.

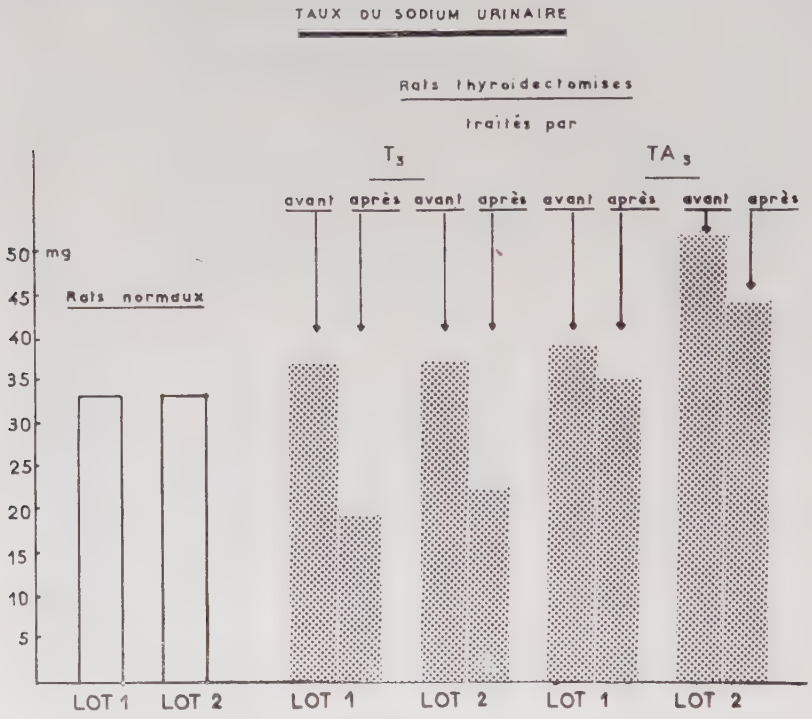


Fig. 10. — Taux de l'élimination rénale du sodium par 24 heures et par lots de 4 rats : normaux, radiothyroïdectomisés et traités par T_3 (0,5 µg) et TA_3 (5 µg).

2. Taux du sodium et du potassium sériques.

Les recherches précédentes ont été complétées par la détermination du taux du sodium et du potassium sériques des animaux expérimentés. Du sang a été prélevé sur chaque animal, et les dosages effectués au photomètre à flamme. Nous avons rassemblé les valeurs obtenues dans le Tableau X — Elles représentent les taux moyens calculés sur six sérums.

La thyroïdectomie provoque une hyponatrémie, conséquence de la « fuite » urinaire du sodium. En revanche on constate une hyperkaliémie compensatrice. Ces troubles sont réduits en partie par l'administration de L-T_3 et TA_3.

Comme le laissait supposer la diminution des corticostéroïdes, la thyroïdectomie perturbe l'équilibre hydro-minéral

TABLEAU X.

Taux du sodium et du potassium sériques des rats normaux thyroïdectomisés et traités par TA_3 ou L-T_3.

Elément dosé	Normaux	Tyroïdectomisés	Tyroïdectomisés et traités par	
			L-T_3 0,5 µg	TA_3 5 µg
Sodium g ‰	3,56	2,97	3,16	3,31
m-Eq	154	129	137	143
Potassium g ‰	0,152	0,205	0,201	0,201
m-Eq	3,8	5,2	5,1	5,1

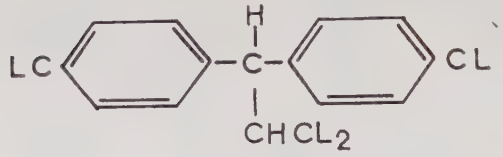
du rat. La réduction de la corticoïdogénèse, et tout particulièrement celle de l'aldostérone provoquent une élimination accrue de l'eau et du sodium. Il en résulte un appauvrissement sérique de ce dernier élément alors que la kaliémie augmente pour réduire le déséquilibre ionique.

Des recherches du même type ont été entreprises par F. Stephan, H. Jahn et B. Metz [52, 53]. Ces auteurs ont étudié les échanges hydrominéraux selon la méthode de Q. Demig et J. Luetscher chez le rat hypothyroïdien. Ils ont conclu que l'insuffisance thyroïdienne accroît, chez cet animal, l'excrétion urinaire de l'eau et du sodium. Leurs résultats sont identiques à ceux que nous avons obtenus.

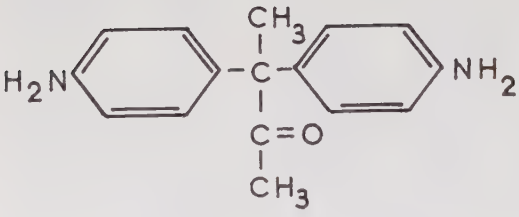
III. — EFFETS DE LA 2-MÉTHYL-1, 2 BIS (3-PYRIDYL)1-PROPANONE (S.U. 4885) SUR LA SÉCRÉTION DES CORTICOSTÉROIDES.

La mise en évidence par A. Nelson et G. Woodward d'une atrophie surrénalienne chez le chien après administration de 2, 2-bis (p. Chlorophényl), 1, 1-dichloroéthane (insecticide D.D.D.) (fig. 11) a été le point de départ de travaux concernant l'activité inhibitrice de dérivés analogues [54]. Le plus étudié d'entre eux est la 3, 3-bis (para-aminophényl)-2-butanone (Amphénone B) préparée par M. Allen et A. Corwin [55] (fig. 11). La synthèse récente de la 2-méthyl-1, 2 bis (3-pyridyl)-1-propanone (SU. 4885) par M. Allen et W. Bencze a été suivie d'intéressantes constatations sur les propriétés de

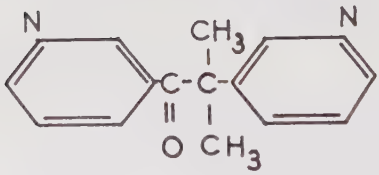
ce corps (fig. 11). J. Chart et ses collaborateurs ont décrit son action inhibitrice sur la sécrétion des corticostéroïdes du chien et du rat [56]. Des précisions furent apportées par G. Liddle, D. Island, E. Lance et A. Harris d'une part [57] et par J. Jenkins et ses collaborateurs d'autre part [58 et 59]. En effet, l'administration de SU 4885 au chien, par voie parentérale, est suivie d'un abaissement caractéristique des corticostéroïdes plasmatiques dont la corticostérone et la 17-hydroxycorticostérone sont les principaux représentants. Fait encore plus



DDD



AMPHENONE



SU. 4885

Fig. 11. — Formules des inhibiteurs de la corticoïdogénèse.

significatif, l'effondrement de ceux-ci est suivi de l'apparition de 11-désoxycorticostéroïdes. La 11-désoxy, 17-hydroxycorticostérone, et la 11-désoxycorticostérone, remplacent respectivement la 17-hydroxycorticostérone et la corticostérone. Ces modifications suggèrent une inhibition des processus de 11-hydroxylation des stéroïdes surrénaliens. Le SU. 4885 semble donc agir avec une sélectivité très particulière. Il représente, avec l'amphénone B un des rares inhibiteurs de la corticoïdogénèse actuellement connus. Ses propriétés ne sont pas sans intérêt. Elles pouvaient nous être utiles. L'hypocorticisme des

rats thyroïdectomisés demeurant un fait acquis, on peut s'interroger sur le processus d'intervention des hormones thyroïdiennes dans la corticoïdogénèse. La comparaison des effets de la thyroïdectomie et du SU. 4885 était susceptible d'apporter des éléments nouveaux. A cette préoccupation, s'en ajoutait une autre. Elle concerne la sécrétion des stéroïdes surrénaliens du rat. Caractérisée par la présence de corticostérone, d'aldostérone, de 11-déhydrocorticostérone, plus divers stéroïdes inconnus, et par l'absence de 17-hydroxycorticostéroïdes, elle représente un type très particulier d'hormonogénèse corticosurrénalienne. Toutes ces raisons, nous ont amené à étudier l'intensité de l'effet inhibiteur du SU. 4885 et la spécificité de son action vis-à-vis des corticostéroïdes du rat.

A. — Action *in vitro* du SU. 4885 sur la corticoïdogénèse chez le rat.

1. — Etude quantitative.

Des surrénales de rats mâles, prélevées sur l'animal anesthésié et coupées en quartiers ont été incubées à 37° C dans du liquide de Krebs pendant 3 heures en présence d'O_2 et sous agitation. Deux paires de surrénales, soit approximativement 50 mg ont été placées dans chaque fiole d'incubation avec 3 ml de solution. Des doses croissantes de SU. 4885 en solution dans le liquide de Krebs ont été ajoutées au liquide d'incubation soit 50. 100. 150. 200. 300 et 400 µg pour 100 mg d'organe. Les corticostéroïdes libérés ont été extraits par du chloroforme et dosés suivant la technique de W. Mader et R. Buck. Celle-ci a été utilisée de préférence à la méthode de A. Gornall et M. Mac Donald, en raison de la présence dans les extraits à doser de traces de SU. 4885, réagissant avec la 2-4 dinitrophénylhydrazine. Les résultats des différentes déterminations sont rassemblés dans le tableau XI.

L'action inhibitrice du SU. 4885 sur la corticoïdogénèse du rat apparaît clairement. Déjà nette en présence de 50 µg, elle s'affirme avec 100 et 150 µg, la diminution du taux des stéroïdes atteignant successivement 15. 25 et 28 %. Celle-ci s'accentue avec des concentrations plus élevées, comme en témoigne l'abaissement de 52 % que nous avons observé. A n'en pas douter, le SU. 4885 se présente comme un actif agent de blocage de la sécrétion corticosurrénalienne.

TABLEAU XI.

Taux des corticostéroïdes totaux libérés in vitro en 3 heures par les surrénales du rat en présence de doses diverses de SU. 4885.

Essais	Corticostéroïdes en µg/g de surrénales	Diminution
Surrénales témoins	170	
Surrénales+SU. 4885 :		
SU. 4885 50 µg	143	15 %
SU. 4885 100 µg	126	25 %
SU. 4885 150 µg	122	28 %
Surrénales témoins	174	
Surrénales+SU. 4885 :		
SU. 4885 200 µg	127	27 %
SU. 4885 300 µg	83	52 %
SU. 4885 400 µg	83	52 %

Il est d'ailleurs singulier de noter que les propriétés de cette substance persistent en présence de corticostimuline (ACTH) (tableau XII). Des surrénales de rats maintenues en survie pendant 3 heures, et stimulées par 1. O, U. I d'ACTH sont incapables sous l'effet du SU. 4885 de produire un taux de corticostéroïdes comparable à celui des organes témoins. Certes, la corticostimuline accroît leur formation même après addition de pyridyl-propanone, mais celle-ci reste bien en deçà de la production normale. Est-ce à dire que l'action de l'inhibiteur est indépendante de celle de l'hormone stimulante ? Il y a tout lieu de le croire. Comme l'indiquent les recherches ultérieures, l'ACTH et le SU. 4885 agissent en des points différents de la

TABLEAU XII.

Taux des corticostéroïdes libérés in vitro en 3 heures par les surrénales du rat mises en présence d'ACTH et de SU. 4885.

Essais	ACTH U.I/100 mg surrénales	SU. 4885 µg/100 mg surrénales	Corticostéroïdes µg g de surrénales	Diminution en %
Surrénales témoins.....	1.0	0	600	
Surrénales+SU. 4885 :				
1	1.0	100	530	11
2	1.0	200	270	55
3	1.0	400	280	53

séquence des réactions assurant la transformation du cholestérol en corticostéroïdes.

2. — Etude qualitative.

Des études plus approfondies s'avéraient nécessaires pour préciser l'action inhibitrice du SU. 4885. L'effondrement caractéristique des corticostéroïdes pouvait, en effet, donner lieu à diverses interprétations. Une diminution généralisée touchant les différentes catégories de stéroïdes n'était pas irréalisable. L'amphénone B n'agit pas autrement [60]. Les conclusions de J. Jenkins, J. Meakin et D. Nelson, établies à partir des variations des 17-hydroxycorticostéroïdes sanguins du chien pressentaient une action plus sélective [59]. Etait-elle transposable chez le rat ? Seules des recherches d'ordre chromatographique étaient susceptibles d'apporter sur ce sujet une réponse valable. Elles furent entreprises à partir de 4 lots de surrénales de rat représentant chacun 100 mg environ de tissus. Les glandes coupées en quartiers ont été incubées à 37° C dans du liquide de Krebs, en présence d'oxygène et de 600, 150, 100 et 50 µg de SU. 4885. Les corticostéroïdes libérés ont été extraits par le chloroforme et séparés dans le système de solvants : benzène-méthanol-eau (100.50.50). Leur identification a été effectuée par pulvérisation sur les chromatogrammes d'une solution alcaline de bleu de tétrazolium, suivie d'un séchage à 80°C et de l'examen en lumière de Wood des taches fluorescentes (fig. 12).

Les enseignements que l'on peut tirer de ces travaux sont aussi nombreux que suggestifs. Ce qui surprend avant tout c'est l'ampleur des modifications que subit la corticoïdogénèse. En effet après addition de 600 µg de SU. 4885, on ne trouve aucune trace sur les chromatogrammes ni des stéroïdes X_1, X_2 et X_3, ni de l'aldostérone. L'absence de coloration par le bleu de tétrazolium et de fluorescence aux U.V. témoigne de leur disparition complète (fig. 12). Par contre, la corticostérone et la 11-déhydrocorticostérone ne subissent que peu de changements. L'intensité de leur coloration et de leur fluorescence est à peu près identique à celle des stéroïdes correspondants, sécrétés par les surrénales-témoins. En revanche, dans l'essai SU. 4885, l'apparition d'un nouveau stéroïde de Rf = 0,90, absent de la sécrétion normale du rat ne manque pas d'être surprenante (fig. 12). Il s'agit d'un corticostéroïde réduisant le bleu de tétrazolium et fluorescent en lumière de Wood. Nous avions tout lieu de croire que ce Δ_4-3-cétostéroïde

réducteur, compte tenu de sa faible polarité et de son Rf élevé dans le mélange benzène-méthanol-eau, pouvait s'apparenter à la 11-désoxycorticostérone. Pour s'en assurer, nous avons procédé à l'incubation de quatre paires de surrénales, en présence de 600 µg de SU. 4885. Les stéroïdes ont été séparés par chromatographie dans le mélange habituel et le stéroïde de

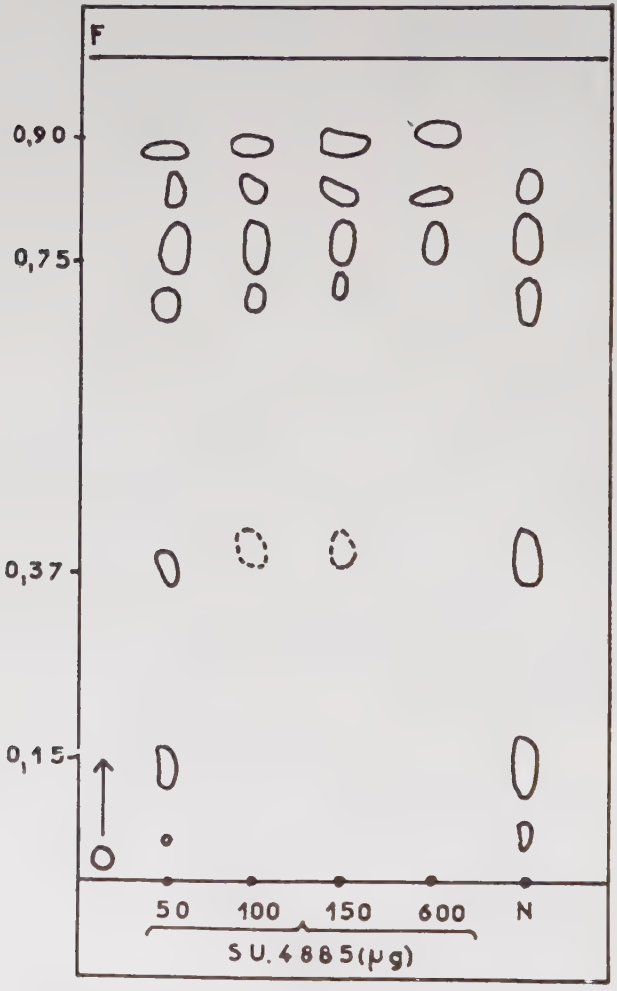


Fig. 12. — Séparation chromatographique des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rats normaux incubées en présence de doses diverses de SU. 4885, en solution dans le liquide de Krebs.
N = Corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales témoins.
Système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100.50.50). T° = 30°C — Papier Whatman 1.

Rf = 0,90 élué par un mélange de chloroforme et de méthanol (1:1 V/V). L'éluat concentré a été ensuite chromatographié dans le système de solvants : éther de pétrole-méthanol-eau (100.80.20) [**29**], en même temps que la 11-désoxycorticostérone-témoin. Après révélation par les procédés habituels, nous avons pu identifier le stéroïde élué à la 11-désoxycorticostérone, la similitude de son Rf (0,35) avec celui de la 11-désoxycorticostérone témoin, dissipait tout malentendu (fig. 13).

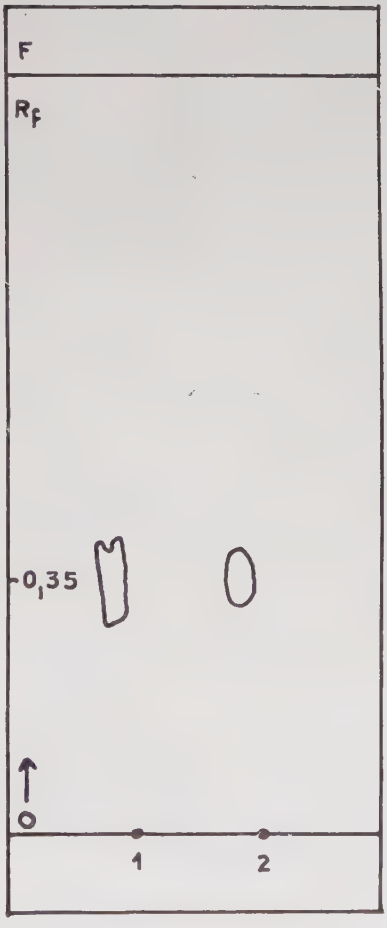


Fig. 13. — Caractérisation chromatographique de la 11-désoxycorticostérone. Solvant : éther de pétrole-méthanol-eau (100.80.20). T° = 30°C. — Papier Whatman 1.

1) 11-désoxycorticostérone éluée.

2) 11-désoxycorticostérone témoin.

En présence de 150 µg de SU. 4885, les résultats diffèrent peu des précédents. Les stéroïdes X_1 et X_2, et l'aldostérone restent indécelables. Le corticostéroïde X_3 réapparaît toutefois mais sa teneur demeure bien en deça des limites normales. Les proportions apparemment normales de la corticostérone et de la 11-déhydrocorticostérone contrastent avec la présence de la 11-désoxycorticostérone (fig. 12). Il en va de même après addition de 100 µg de SU. 4885 au milieu d'incubation des surrénales. Ajoutons que dans ces deux expériences, nous avons remarqué après révélation des chromatogrammes par le bleu de tétrazolium et chauffage à 80°C des spots bleu non fluorescents aux U.V. et ayant un Rf = 0,41 très légèrement supérieur à celui de l'aldostérone (Rf = 0,38) (fig. 12). S'agit-il d'un stéroïde à chaine α-cétolique dont le noyau A se trouve réduit ? Ce n'est qu'une hypothèse, mais nous avons été frappé par la similitude des Rf (0,41) de ce corps inconnu avec la Δ_1-4 prégnanedione, 17, 21-diol, 3,11,20-trione dans le système de solvants : benzène-méthanol-eau.

A dose moindre (50 µg) on assiste à la réapparition progressive de tous les stéroïdes, mais celle-ci est encore suffisante pour inhiber partiellement la sécrétion des stéroïdes X_1, X_2 et de l'aldostérone. La 11-désoxycorticostérone est présente quoique en quantité très faible (fig. 12).

D'une manière générale, la quantité de 11-désoxycorticostérone est d'autant plus élevée que l'inhibition de la sécrétion des stéroïdes X_1, X_2, X_3 et de l'aldostérone est plus sévère. Elle diminue progressivement au fur et à mesure de leur libération. La sécrétion de la corticostérone et de la 11-déhydrocorticostérone semble à première vue normale. Cette constatation est apparemment en contradiction avec les conclusions de J. Jenkins et de ses collaborateurs. Sa signification sera discutée ultérieurement.

Les chromatogrammes réalisés après incubation de surrénales en présence de 1.0 U.I. d'ACTH et de 400 et 200 µg de SU. 4885 pour 100 mg d'organes, confirment les observations précédentes. Les stéroïdes X_1, X_2 et l'aldostérone sont indécelables alors que la 11-désoxycorticostérone est fort bien individualisée (fig. 14).

B) Action *in vivo* du SU. 4885.

Mis en présence de coupes de surrénales, le SU. 4885 se comporte comme un inhibiteur puissant de la corticoïdogénèse.

On peut se demander si cette substance conserve des propriétés identiques après administration *in vivo* et si elle agit avec la même efficacité qu'*in vitro*. Il n'était donc pas sans intérêt de connaître les modifications de l'activité corticosurrénalienne du rat traité par le SU 4885.

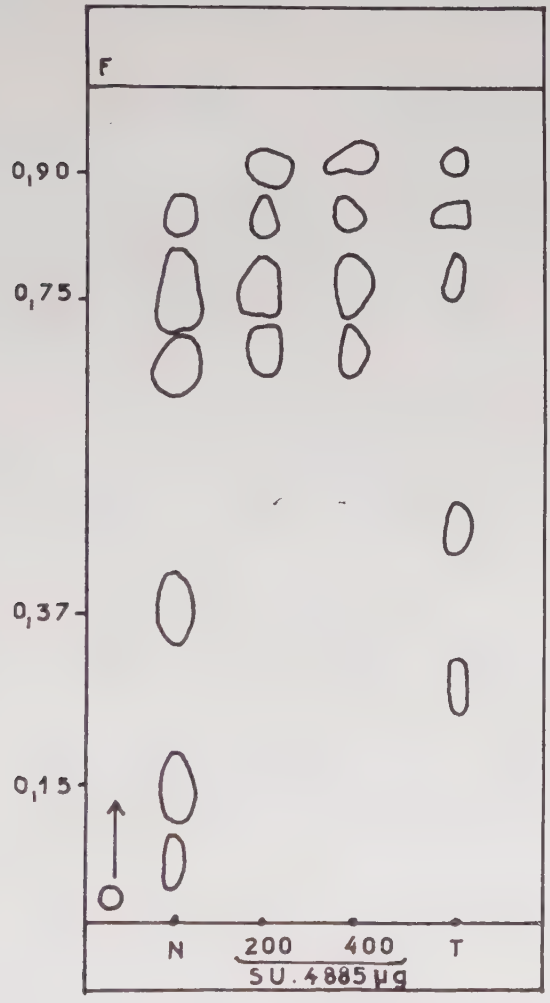


Fig. 14. — Chromatogramme de corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rats incubées en présence de SU. 4885 et d'ACTH.
N = Corticostéroïdes libérés par des surrénales témoins en présence d'ACTH.
T = Stéroïdes de référence.
Système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100.50.50). T° = 30°C. — Papier Whatman 1.

Seize rats mâles pesant environ 80 g chacun, ont reçu pendant 3 semaines une injection quotidienne intrapéritonéale de 10 mg de SU. 4885. Les animaux ont été sacrifiés et les surrénales mises à incuber dans du liquide de Krebs. Les animaux ont été pesés avant et après le traitement. Du sang a été prélevé sur chacun d'eux pour la détermination du sodium et du potassium sériques.

1) Actions générales du SU. 4885.

Injecté à la dose de 10 mg, le SU 4885 possède une action hypnotique. Aussitôt après l'injection, les animaux accusent une profonde dépression et un état de somnolence qui se prolonge plusieurs heures. Ces phénomènes ont été observés pendant les huit premiers jours du traitement. Une certaine accoutumance s'est ensuite manifestée et nous avons constaté ultérieurement que l'administration de cette substance provoquait au contraire un syndrome d'excitation intense. L'augmentation de poids des animaux traités est moins importante que celle des témoins, en raison vraisemblablement des pertes d'eau de l'organisme par augmentation de la diurèse (Tableau XIII). Par contre, l'hypertrophie de leurs surrénales est considérable (Tableau XIII). Par leur taille et leur poids, elles diffèrent très nettement des glandes des animaux témoins.

TABLEAU XIII.

Actions générales du SU. 4885.

Lots de 4 rats	Poids corporel moyen en g			Poids des surrénales mg/paire	Na sérique g ‰	K g ‰
	Avant traitement	Après traitement	Augmentation			
Animaux traités :						
Lot 1.....	78	104	+ 26	35	3,17	0,195
Lot 2.....	75	120	+ 45	49	3,23	0,183
Lot 3.....	83	110	+ 27	38	3,16	0,175
Lot 4.....	78	114	+ 36	36	3,20	0,180
Animaux témoins :						
Lot 1.....	95	124	+ 29	26	3,30	0,180
Lot 2.....	85	130	+ 45	30	3,31	0,160
Lot 3.....	82	142	+ 60	26	3,30	0,170
Lot 4.....	85	145	+ 60	27	3,40	0,175

Les déterminations du sodium et du potassium sériques font apparaître de légères modifications. Nous avons observé après 3 semaines de traitement une légère hyponatrémie et une faible élévation de la Kaliémie (Tableau XIII).

2) Modifications de la sécrétion des stéroïdes.

Trois semaines après la première injection de SU. 4885 les animaux traités et témoins ont été sacrifiés. Les surrénales coupées en quartiers ont été mises à incuber dans du liquide de Krebs en présence d'O_2, pendant 3 heures. Les stéroïdes libérés par les surrénales des lots 1 ont été dosés suivant la technique de A. Gornall et M. Mac Donald. Ceux des lots 2 ont été séparés par chromatographie sur papier dans le mélange benzène-méthanol-eau (100.50.50), révélés par le bleu de tétrazolium et examinés aux U.V. (fig. 15). Les stéroïdes des lots 3 et 4 ont été individualisés dans le même système de solvants et dosés séparément après élution par l'éthanol redistillé.

Il ressort de ces différents examens que l'inhibition de la corticoïdogénèse est importante puisque le dosage des stéroïdes totaux libérés par les surrénales de rats traités laisse apparaître une diminution de 46 % (Tableau XIV). Les déterminations individuelles des hormones de la corticosurrénale confirment ces résultats (Tableau XIV). Les stéroïdes X_1, X_2 et l'aldostérone sont les plus affectés. Leurs taux sont nettement inférieurs aux normaux. Il en est de même du stéroïde X_3 dont l'abaissement est visible sur le chromatogramme (fig. 15).

TABLEAU XIV.

Taux des stéroïdes libérés en 3 heures par les surrénales de rats normaux et traités par le SU. 4885 (en µg/1g de surrénales).

	Rats normaux	Rats traités par le SU 4885
Stéroïdes totaux (Lots 1).....	182	98
Stéroïdes élués (Lots 3 et 4)		
$X_1 + X_2$.....	27	10
Aldostérone.....	40	15
X_3 + corticostérone.....	45	25
11-déhydrocorticostérone	22	12

L'examen du chromatogramme des stéroïdes sécrétés par les surrénales des lots 2, nous a permis de préciser les effets du SU. 4885 après administration parentérale (fig. 15). Son activité anti-hormonale affecte principalement les stéroïdes les plus polaires tels que les composés X_1, X_2, X_3 et l'aldostérone. La corticostérone ne subit pas de modifications tandis que la 11-déhydrocorticostérone est légèrement diminuée. Par

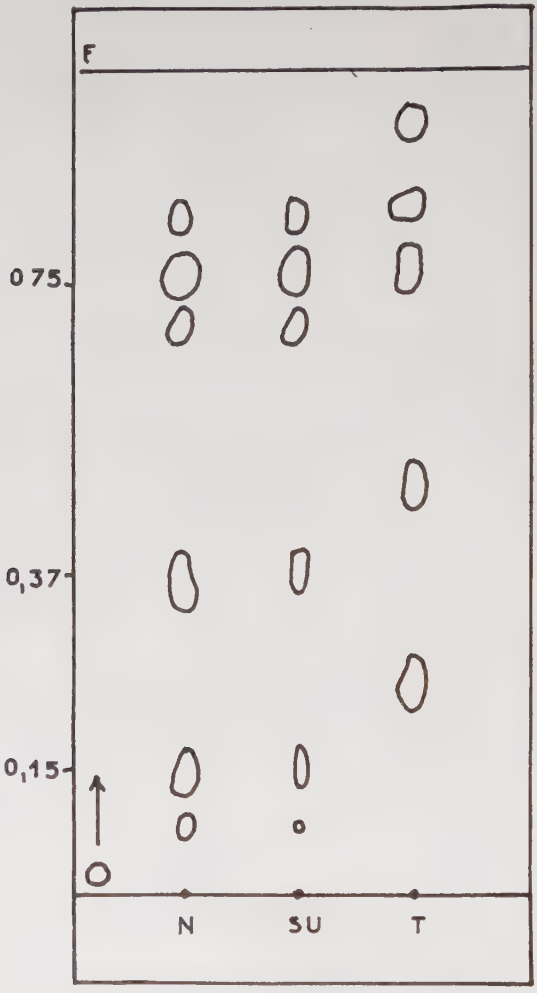


Fig. 15. — Séparation chromatographique des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rats normaux (N) ou traités par le SU. 4885 (SU). T = Corticostéroïdes de référence. Système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100.50.50). T° : 30°C. Papier Whatman 1.

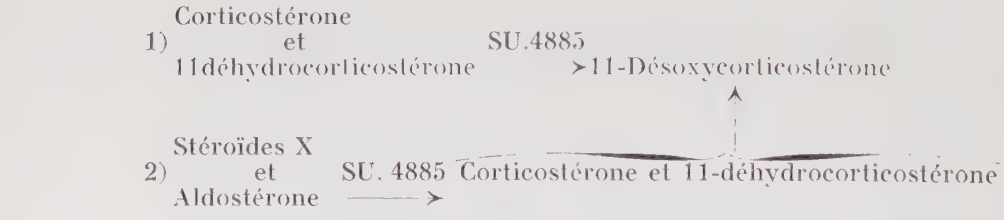
contre, nous n'avons pas pu caractériser avec certitude, la 11-désoxycorticostérone. On ne saurait nier d'une manière absolue son absence car il est possible qu'elle existe à un taux trop faible pour être détectée. L'action inhibitrice du SU, vis-à-vis des stéroïdes X_1, X_2, X_3 et de l'aldostérone est, vraisemblablement insuffisante pour provoquer une augmentation caractérisée de la 11-désoxycorticostérone. Il faut d'ailleurs noter qu'après administration *in vivo*, l'action du SU. 4885 sur la corticoïdogénèse apparaît moins brutale qu'après addition au liquide d'incubation. Nous n'avons pas observé, comme précédemment, de disparition des stéroïdes polaires. Il n'est pas exclu qu'une certaine accoutumance se soit manifestée au cours du traitement. Seule l'identification des stéroïdes effectuée à différentes périodes du traitement, aurait été susceptible de confirmer cette hypothèse. On peut aussi avancer que la dose journalière administrée était insuffisante en raison de la diffusion du SU dans l'organisme pour provoquer des désordres comparables à ceux que nous avons relatés.

C) Discussion des résultats.

Nous nous sommes préoccupés d'étudier les propriétés du SU. 4885 sur la corticoïdogénèse très particulière du rat. La méthode d'incubation *in vitro* des surrénales nous a permis d'observer un certain nombre de faits, dont l'un des plus marquants concerne l'efficacité des propriétés inhibitrices de cette subtance. En effet, le taux des stéroïdes libérés diminue de moitié, lorsque les surrénales sont incubées en présence de 300 µg de SU. J. Chart et ses collaborateurs ont eux-mêmes obtenu une baisse identique avec des concentrations du même ordre (50 mg par litre de liquide d'incubation) [56]. La diméthyl dipyridyl-propanone est donc capable de réaliser une inhibition partielle et transitoire de la corticoïdogénèse. Elle n'en agit pas moins avec une certaine sélectivité comme en témoignent les chromatogrammes réalisés au cours de nos expériences. Ce qui est significatif c'est d'une part la disparition des stéroïdes très polaires et de l'aldostérone, et d'autre part, l'apparition de la 11-désoxycorticostérone absente de la sécrétion normale du rat. Cette constatation souligne les profondes modifications subies par la corticoïdogénèse. La mise en évidence de ce dernier stéroïde permet de conclure que la 11-hydroxylase se trouve inhibée et que par conséquent les processus de 11-hydroxylation des stéroïdes sont supprimés en tout ou par-

tie. J. Jenkins a déjà signalé cet aspect particulier de l'action du SU. 4885, l'apparition de la 11-désoxycorticostérone allant de pair avec l'effondrement de la corticostérone plasmatique du chien [59]. Toutefois, nous n'avons jamais observé de modifications de ce stéroïde. On peut donc s'interroger sur l'origine de la 11-désoxycorticostérone. Il serait évidemment logique d'attribuer sa libération à un défaut de synthèse soit de la corticostérone, soit de la 11-déhydrocorticostérone. On peut admettre qu'il en est ainsi chez le rat, mais que la disparition des stéroïdes X_1, X_2, X_3 et de l'aldostérone masque en partie ce phénomène.

Il est certain que le SU. 4885 n'agit pas seulement sur la 11-hydroxylase, la disparition de l'aldostérone montre que la 18-hydroxylase se trouve elle-même inhibée. Ce fait mérite d'être souligné, car il n'a pas encore été signalé. La diminution des stéroïdes X_1, X_2 et X_3, voire même leur suppression implique un blocage de certaines réactions enzymatiques, sur la nature desquelles il est malheureusement difficile d'émettre une opinion définitive. Nous pensons que les résultats obtenus peuvent être résumés dans le schéma suivant :



Cette interprétation rend compte à la fois de la formation de la 11-désoxycorticostérone, et de la disparition des stéroïdes polaires et de l'hormone minéralotrope. Elle permet, en outre, de comprendre les variations inapparentes de la corticostérone et de la 11-déhydrocorticostérone. Reste à savoir si celles-ci peuvent être considérées comme des précurseurs de l'aldostérone. Des vérifications s'avéraient indispensables. Elles ont été effectuées en faisant incuber pendant 3 heures dans du liquide de Krebs des lots de surrénales, en présence de 32 µg. de 11-désoxycorticostérone, de 35 µg de 11-déhydrocorticostérone, et de 36 µg de corticostérone pour 100 mg de tissus. Ces hormones ont été dissoutes dans 0,10 ml de méthanol et ajoutées au milieu d'incubation. Les stéroïdes libérés ont été séparés par chromatographie sur papier dans le mélange benzène-méthanol-eau (100.50.50). Les chromatogrammes ont été soumis à

la densitométrie ultra-violette à 253 mμ (figure 16) puis révélés par le bleu de tétrazolium et enfin examinés en lumière de Wood (fig. 17).

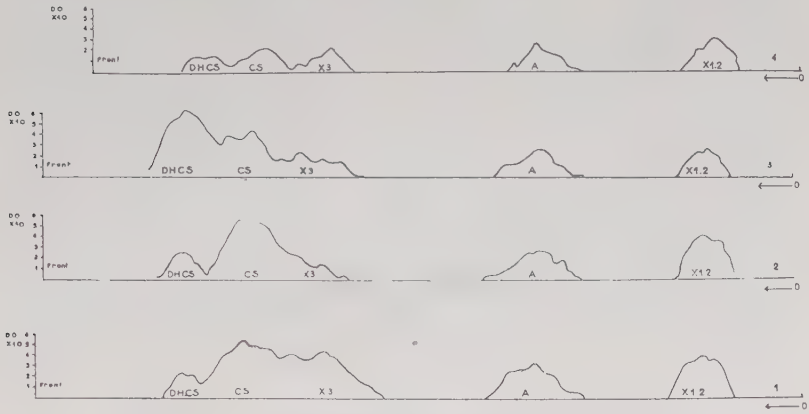


Fig. 16. — Courbes d'absorption à 253 mμ des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rat après addition au milieu d'incubation.

1 = de 11-désoxycorticostérone
2 = de corticostérone
3 = de 11-déhydrocorticostérone
4 = Corticostéroïdes libérés par les surrénales-témoins.

Système de solvants : Benzène-Méthanol-eau (100.50.50) T°/30° C Papier Whatman 1.

L'addition de 11-désoxycorticostérone provoque une libération considérable de la corticostérone et du stéroïde X_3. L'aldostérone et le stéroïde X_2 sont eux-mêmes très largement augmentés. On peut donc considérer ce stéroïde comme l'un des précurseurs immédiats des hormones de la corticosurrénale. Il occupe certainement une position-clef dans la corticoïdogénèse. Nous avons d'ailleurs été surpris de la facilité avec laquelle il se trouvait incorporé, puisque nous n'avons pas retrouvé trace sur nos chromatogrammes des 32 ug de 11-désoxycorticostérone ajoutés au liquide de Krebs.

La corticostérone est elle-même en partie métabolisée, comme le prouve l'augmentation substantielle de l'aldostérone et du stéroïde X_2, alors que la 11-déhydrocorticostérone, et le stéroïde X_3 ne semblent pas subir de modifications (fig. 16 et 17).

L'incubation de 11-déhydrocorticostérone n'affecte pas la sécrétion de la corticostérone et du stéroïde X_3. Le stéroïde X_2 et l'aldostérone sont incontestablement influencés et, phé-

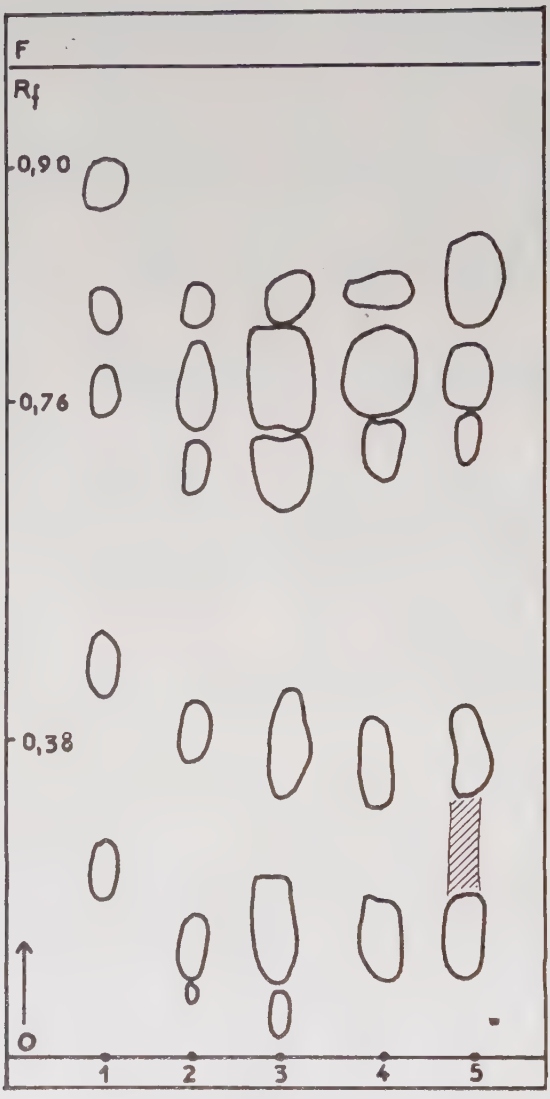


Fig. 17. — Chromatogramme des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales :

2 = de rats normaux.
3 = incubées en présence de 11-désoxycorticostérone,
4 = incubées en présence de corticostérone,
5 = incubées en présence de 11-déhydrocorticostérone,
1 = stéroïdes de référence.

Système de solvants : Benzène - Méthanol - eau (100.50.50). T° = 30° C.

nomène curieux, entre eux apparaît un nouveau stéroïde colorable au bleu de tétrazolium mais non fluorescent aux U.V. Ce stéroïde réducteur, dont le cycle A est vraisemblablement réduit, est en quantité appréciable (fig. 17).

Ces résultats montrent l'étroite dépendance des différents stéroïdes. Ils nous ont permis de confirmer l'hypothèse que nous avions émise sur le mode d'action du SU. 4885, et d'expliquer la formation apparemment paradoxale de la 11-désoxycorticostérone alors que la corticostérone paraissait normale.

Il va sans dire que le SU. 4885 représente l'un des inhibiteurs les plus intéressants de la corticoïdogénèse. En étudiant ses propriétés, en précisant son mode d'intervention, nous avons pu constater que ses effets sont très différents de ceux de l'ablation des thyroïdes. L'origine des troubles de la corticoïdogénèse consécutifs à la thyroïdectomie reste donc à préciser.

IV. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Les études antérieures aux nôtres avaient été unanimes à souligner l'étroite dépendance entre les glandes thyroïde et surrénales. Les modifications pondérales des surrénales, les variations de l'acide ascorbique montraient que la thyroïde est nécessaire au développement et au fonctionnement de ces glandes. Le dosage de l'ascorbie surrénalienne, celui des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques indiquaient l'existence de relations entre la thyroïde et la partie corticale des surrénales. Toutefois nul travail n'avait tenté de définir la corticoïdogénèse du rat thyroïdectomisé, ou traité par les hormones thyroïdiennes. Celle-ci représentant l'activité essentielle de la corticosurrénale, son étude était primordiale et elle pouvait être entreprise sur le plan biochimique. C'est sous cet angle que nous l'avons envisagée afin de préciser la nature des rapports thyro-corticosurrénaliens.

Il est incontestable que la destruction des thyroïdes affecte la stéroïdogénèse. La diminution des stéroïdes totaux est sur ce point significative, puisqu'elle atteint 40 %. Elle est d'ailleurs générale. Il n'existe pas de modification sélective de celle-ci, les taux des différents stéroïdes se trouvant tous identiquement abaissés en même temps. Des troubles dans l'équilibre hydro-minéral se manifestant, le ralentissement de la synthèse des minéralocorticoïdes et principalement de l'aldostérone se traduit par une élimination accrue d'eau et de sodium.

L'hyponatrémie, consécutive à la fuite rénale du sodium, et l'hyperkaliémie compensatrice qui en résulte complètent les désordres électrolytiques.

Injectées à faibles doses, la thyroxine et la 3.5.3' triiodothyronine sont incapables de rétablir complètement la corticoïdogénèse. Certes l'augmentation des stéroïdes après injection de L-T_3 n'est pas négligeable, mais elle reste en-deçà des valeurs normales. Les quantités d'iodothyronines injectées ont peut-être été insuffisantes pour agir efficacement sur le métabolisme de la corticosurrénale et restaurer sa sécrétion. D. Wallach et E. Reineke ont montré l'existence de doses limites de thyroxine, sans effet sur les surrénales [12]. Telle est également l'opinion de M. Maqsood. Selon lui, des quantités de thyroxine égales ou inférieures à la sécrétion endogène thyroïdienne n'affectent pas le poids des surrénales [9]. Il n'est pas exclu, non plus, qu'au cours du traitement la corticoïdogénèse passe par diverses phases d'activité. On peut envisager dès les premières semaines une augmentation substantielle des stéroïdes, par suite de l'accélération des échanges métaboliques. Cette dernière peut conduire en se maintenant, à un épuisement progressif des surrénales. De plus, la libération accrue des corticostéroïdes, se traduisant par une élévation de leur taux sanguin, peut déclencher un blocage partiel de la corticostimuline, qui, en retour, ralentit la stéroïdogénèse. On conçoit donc la complexité des phénomènes susceptibles d'intervenir simultanément. Des dosages systématiques, échelonnés au cours du traitement seraient nécessaires pour valider cette hypothèse. Cependant, les variations de l'ascorbie surrénalienne semblent la confirmer. D. Wallach et E. Reineke ont en effet observé une baisse importante de l'ascorbie surrénalienne après injection pendant quatre jours de 20 µg de dl-thyroxine, puis un retour au taux normal au bout de 15 jours et une augmentation considérable après 28 jours de traitement [12]. Ils en déduisent que l'hyperthyroïdisme détermine un accroissement de la synthèse et de la libération des stéroïdes qui en retour inhibe la sécrétion d'A C T H. M. Kimura a de son côté noté une élévation de l'acide ascorbique surrénalien de rats traités pendant quatre semaines par des préparations thyroïdiennes [13]. Il semble donc, en définitive, que, sous l'influence de la thyroxine ou de son homologue triiodé, la corticoïdogénèse subisse des modifications successives.

L'intégrité de la thyroïde étant incontestablement nécessaire au fonctionnement normal de la corticosurrénale, il reste à déterminer le mode d'intervention des hormones thyroïdiennes.

Dans l'ensemble, tous les auteurs qui se sont préoccupés des relations thyro-surrénaliennes admettent une intervention hypophysaire. D. Ingle et G. Higgins furent les premiers, semble-t-il, à émettre cette opinion. Il leur fut impossible, en effet, de constater la régénération par la thyroxine, du cortex des surrénales de rats hypophysectomisés, contrairement à ce qui se passe chez l'animal normal [2]. Selon eux, la thyroxine agit en stimulant la sécrétion hypophysaire de la corticostimuline.

L'étude des modifications morphologiques des surrénales de rats thyroïdectomisés ou hypophysectomisés, traités ou non par la thyroxine, a conduit J. Feldman à adopter des conclusions identiques [7]. La thyroïdectomie réduit l'activité de l'hypophyse et secondairement celle des surrénales. L'administration de thyroxine produit l'effet inverse. Quelques années auparavant H. Deane et R. Greep avaient attribués la diminution de la taille des surrénales du rat hypothyroïdien et l'atrophie de leur zone glomérulée à une diminution de la sécrétion d'A C T H [6]. On ne s'étonnera donc pas que M. Zarrow et I. Zarrow aient émis une hypothèse semblable, à vrai dire séduisante et largement répandue [61]. Elle repose sur les variations du taux de la thyréostimuline (T S H) chez le rat thyroïdectomisé. L'hypersécrétion de T S H consécutive à l'ablation des thyroïdes ou à l'hypothyroïdisme entraîne une hyposécrétion d'A C T H responsable en définitif de l'atrophie des surrénales. Inversement, l'hyperactivité de la thyroïde freinant la sécrétion de T S H permet un accroissement de la production hypophysaire d'A C T H. Cette conception ne manque pas de logique. Il ne semble pas malheureusement qu'elle ait reçu de confirmation expérimentale.

Une étude approfondie des propriétés physiologiques de la thyroxine a été effectuée, il y a quelques années par H. Eartly et C. Leblond [62]. Elle a permis de classer les effets de cette hormone en trois catégories :

— ceux qui persistent en l'absence d'hypophyse ;
— ceux qui sont partiellement restaurés ;
— ceux qui n'apparaissent pas après l'hypophysectomie.

Les modifications pondérales des surrénales appartiennent à cette dernière. Si la thyroxine agit sur le développement des surrénales, c'est donc par l'intermédiaire de l'hypophyse et de ses stimulines.

L'hypocorticisme des rats thyroïdectomisés est totalement différent de celui que provoque le SU. 4885. Cet inhibiteur agit d'une manière très spécifique. La suppression des stéroïdes

polaires et de l'aldostérone, l'apparition de la 11-désoxycorticostérone, témoignent des profondes modifications subies par la corticoïdogénèse. L'inhibition des 18 et 11-hydroxylases expliquent la disparition de la première, la formation de la seconde. Rien de tel, après destruction des thyroïdes. L'action du SU. 4885 se situe au niveau de la corticosurrénale. Il est même aisé de préciser les points de son intervention dans la

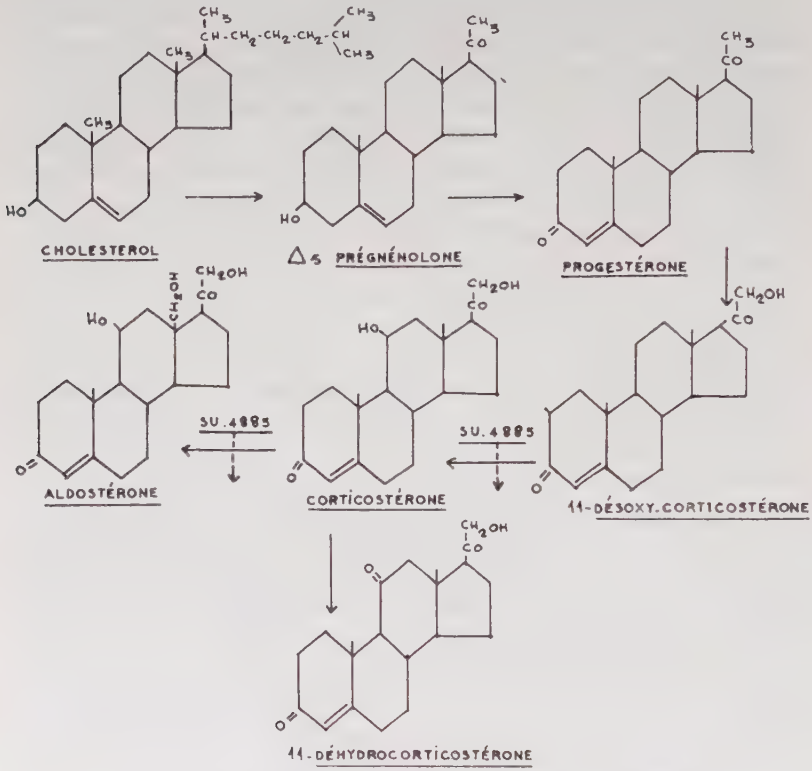


Fig. 18. — Localisation de l'intervention du SU.4885 dans la biogénèse des corticostéroïdes chez le rat.

biogénèse des corticostéroïdes (fig. 18). L'hypocorticisme des rats thyroïdectomisés et celui des animaux traités par le SU. 4885 n'ont donc rien de commun. Le premier résulte vraisemblablement de phénomènes complexes qui doivent tenir compte à la fois des modifications du métabolisme général de l'animal thyréoprive et de l'intervention des stimulines hypophysaires ; le second est dû à un blocage de certaines réactions enzymatiques de la corticoïdogénèse.

CHAPITRE III.

RECHERCHES SUR LE MODE D'INTERVENTION DES HORMONES THYROÏDIENNES DANS LA CORTICOIDOGÉNÈSE.

INTRODUCTION.

L'hypocorticisme de l'animal thyréoprive est bien établi ; la destruction des thyroïdes engendre un ralentissement sévère de la synthèse et de la libération des corticostéroïdes et ce phénomène général affecte à la fois les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. L'administration quotidienne de thyroxine ou de 3:5:3'-triiodothyronine à des doses physiologiques rétablit en partie la sécrétion des corticosurrénales. Ces constatations, montrent que toute modification de la sécrétion thyroïdienne retentit sur l'activité hormonale du cortex surrénal. Elles devaient nécessairement susciter l'étude du rôle des iodothyronines dans la biogénèse des corticostéroïdes.

La question nous a paru mériter d'être posée. On connaît, certes, les relations étroites qui unissent la préhypophyse et la corticosurrénale. L'activité de celle-ci est généralement considérée comme étant sous le contrôle exclusif de la corticostimuline. Dès lors, pouvait-on raisonnablement envisager une participation proche ou lointaine des hormones thyroïdiennes aux mécanismes qui concourent à la formation des stéroïdes surrénaliens.

Un certain nombre de données expérimentales concernant la pénétration des iodothyronines dans l'hypophyse et les surrénales ont été établies. R. Courrier, J. Roche, O. Michel, R. Michel et R. Colonge ont étudié leur répartition dans les différentes parties de l'hypophyse du lapin [63] : elles se concentrent préférentiellement dans la posthypophyse. Les mêmes

auteurs ont montré également leur passage dans l'antéhypophyse, où la 3.5.3'-triiodothyronine se fixe en quantité beaucoup plus grande que ses homologues. Leur présence dans cette région de la plande pituitaire a une signification physiologique précise, sans doute le contrôle de la sécrétion de l'hormone thyréotrope. Il n'est cependant pas exclu qu'en dehors de cette fonction particulière, les iodothyronines n'y exercent pas leurs effets métaboliques propres. Leur activité cellulaire pourrait alors concourir à l'élaboration et à l'excrétion des autres stimulines préhypophysaires.

La localisation intra-surrénalienne des hormones thyroïdiennes a également été établie [64] ; de même celle de l'acide 3.5.3'-triiodothyroacétique, dérivé du métabolisme tissulaire de la L-3.5.3'-triiodothyronine [65 et 66]. Sans présumer de leur rôle, on peut supposer qu'elles participent à l'équilibre fonctionnel des surrénales et, par conséquent, envisager une double action thyroïdienne, l'une indirecte par voie hypophysaire et l'autre directe, au niveau des capsules surrénales.

Seul, le premier aspect semble avoir été retenu, et presque unanimement accepté. Qu'ils aient étudié les modifications structurales des surrénales, ou leur teneur en acide ascorbique chez l'animal thyroïdectomisé ou traité par les iodothyronines, la plupart des auteurs ont accusé les variations de la corticostimuline. Dès 1938, D. Ingle et G. Higgins au cours de leur étude de la régénération des surrénales énuclées du rat traité par la thyroxine, ont attribué les effets de cette dernière à une intervention hypophysaire, s'exerçant vraisemblablement par l'intermédiaire de l'hormone corticotrope [2]. H. Deane et R. Greep ont émis une hypothèse identique ; ils ont imputé la réduction de la zone glomérulée des surrénales des rats hypothyroïdiens à une hyposécrétion d'ACTH et, inversement, son augmentation au cours de l'hyperthyroïdisme à un accroissement du taux de la corticostimuline [6]. J. Feldman a tiré des conclusions voisines de recherches morphologiques chez le rat thyroïdectomisé et hypophysectomisé et envisagé que la thyroxine agit par relais hypophysaire [7]. Selon lui, l'ACTH est la seule hormone capable d'influencer directement la taille, le poids et la structure histologique du cortex surrénalien. Toutes ces opinions concordent, sans toutefois définir l'origine des troubles de la corticostimuline.

On conçoit donc aisément que les explications de M. Zarrow et I. Zarrow aient été, en général, admises. Elles complètent les précédentes en faisant intervenir la thyréostimu-

line. M. et I. Zarrow supposent, en effet, que l'hyperproduction d'hormone thyréotrope consécutive à la thyroïdectomie, inhibe la sécrétion hypophysaire de corticostimuline et provoque finalement l'atrophie des surrénales [61]. Cette conception logique attribue aux variations de la thyréostimuline un rôle prédominant dans les facteurs endocriniens responsables des modifications des surrénales au cours des états d'hypo ou d'hyperthyroïdie. On peut toutefois se demander, si les modifications des surrénales constatées après thyroïdectomie sont imputables en définitive à la seule hyposécrétion d'homme corticotrope. Autrement dit, l'antagonisme entre les stimulines corticotrope et thyréotrope est-il seul en cause ?

Il est vraisemblable que les relations hypophyso-thyroïdiennes ne se limitent pas à une interférence entre ces stimulines. L'intervention de la thyroïde dans les phénomènes de croissance a depuis longtemps attiré l'attention sur la similitude des propriétés de la thyroxine et de l'hormone somatotrope dans ce domaine. H. Evans, M. Simpson et R. Pencharz ont dès 1939, montré l'action synergique de ces deux hormones [3]. Leurs résultats indiquent que la stimulation de la croissance corporelle des rats thyroïdectomisés recevant de la thyroxine n'est possible qu'en présence d'hypophyse et que les effets périphériques de cette hormone et de la somatostimuline se complètent. Leur action sur le poids des surrénales est particulièrement nette. Le problème a été repris par R. Scow et W. Marc. Etudiant la croissance du rat thyréoprive, ils constatèrent que l'hormone de croissance est beaucoup plus active chez l'animal porteur de restes de thyroïde que chez les sujets complètement thyroïdectomisés [67]. Les expériences de H. Becks, M. Simpson et Coll, sur le nanisme thyréo-hypophysoprive démontrent clairement que la thyroxine augmente l'efficacité de l'hormone somatotrope [68]. B. Scow, M. Simpson et Coll, suggèrent que le nanisme des rats thyroïdectomisés est dû à une hyposécrétion de somatostimuline [4]. Ils remarquent que la thyroxine soit seule, soit en association avec l'hormone de croissance, augmente la croissance pondérale des surrénales. Il n'est pas douteux que les hormones thyroïdiennes favorisent l'élaboration de l'hormone somatotrope et renforcent son action métabolique. On peut donc se demander si les modifications de poids des surrénales thyroïdectomisés ou traités par les iodothyronines ne sont pas, en définitive, consécutives aux variations de cette stimuline hypophysaire. C'est l'opinion que l'on retire des travaux de H. Selye. Cette hormone est, en

effet, capable de stimuler la croissance des surrénales des rats normaux et thyroïdectomisés [69 et 70]. A la suite, de leurs premières observations, P. Bois et H. Selye ont étudié plus particulièrement les effets synergiques de la thyroxine et de l'hormone somatotrope vis-à-vis des surrénales [71]. Ils ont utilisé pour cela, une préparation de somatostimuline, hautement purifiée et dépourvue de toute activité corticotrope. Leurs conclusions indiquent que celle-ci possède envers les surrénales des propriétés stimulantes différentes de celles de l'ACTH et qu'elles sont considérablement affaiblies après thyroïdectomie. La thyroxine au contraire, accroît singulièrement l'effet corticotropique de la somatostimuline, alors qu'elle ne renforce pas l'augmentation pondérale des surrénales de rats traités à l'ACTH. Il faut donc admettre que celle-ci dépend de l'action combinée de l'hormone somatotrope et des hormones thyroïdiennes.

Le problème apparaît donc comme très complexe en raison de la diversité des aspects que revêt le mode d'intervention des iodothyronines dans le métabolisme des surrénales. A la lumière des travaux cités, les hormones thyroïdiennes paraissent agir en régularisant l'élaboration et l'excrétion des stimulines hypophysaires, sans exclure pour autant leur participation directe à l'hormonogénèse corticosurrénalienne. Il est regrettable certes, que les travaux précédents ne fassent état que des variations de poids des surrénales, car il n'est pas certain, qu'il existe une relation de cause à effet entre les modifications pondérales d'une glande endocrine et son activité hormonale. Il était donc nécessaire de préciser les modalités de l'action des hormones thyroïdiennes sur la corticoïdogénèse. C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement attaché à l'étude de la sécrétion hypophysaire de l'hormone corticotrope du rat thyroïdectomisé et traité par les iodothyronines. Etant donné le rôle particulier de cette stimuline, il était essentiel de connaître ses variations afin de savoir si elle représente l'élément prédominant des modifications de la corticoïdogénèse observées au cours des différents états thyroïdiens. Nous avons, en outre, à la suite des travaux de P. Bois et H. Selye recherché si l'hormone somatotrope exerce une action sur la sécrétion des stéroïdes surrénaliens. Ces recherches étaient nécessaires pour faire la part des propriétés qui reviennent à l'une et à l'autre vis-à-vis de la stéroïdogénèse corticosurrénalienne.

I. — ACTION DE L'HORMONE CORTICOTROPE (ACTH) *IN VITRO* SUR LES SURRÉNALES DE RATS NORMAUX ET THYROIDECTOMISÉS.

Les modifications de l'activité des surrénales après thyroïdectomie ou administration d'hormones thyroïdiennes sont généralement attribuées aux variations de l'ACTH. Selon M. et I. Zarrow la thyréostimuline provoquerait suivant son taux, un affaiblissement ou au contraire une exaltation de la sécrétion hypophysaire d'hormone corticotrope ; l'hypocorticisme du rat thyroïdectomisé serait alors imputable à une déficience de corticostimuline. S'il en est ainsi, on peut penser que les surrénales du rat thyroïdectomisé conservent leur réactivité vis-à-vis de l'ACTH et que, mises en présence de corticostimuline, elles doivent répondre normalement. C'est pourquoi nous avons cherché à mesurer l'intensité de la corticoïdogénèse après addition *in vitro* d'hormone corticotrope à des surrénales de rats normaux ou thyroïdectomisés.

Nous avons utilisé pour ces expériences des rats mâles radiothyroïdectomisés depuis quatre semaines, et des rats normaux témoins. Leurs surrénales ont été prélevées sous anesthésie, découpées en quartiers et mises à incuber dans du liquide de Krebs, à 37°C, en présence d'oxygène. Après une période de préincubation de 30 minutes, qui accroît la sensibilité des surrénales à l'action de l'ACTH, le milieu de Krebs est éliminé, et remplacé par un volume identique de liquide renfermant la corticostimuline. Vingt mg d'ACTH (Choay) y ont été ajoutés pour 100 mg de tissu. La période d'incubation proprement dite est de 3 heures, après quoi, les corticostéroïdes libérés ont été extraits par le chloroforme. Les solutions chloroformiques ont été évaporées à siccité au moyen de l'évaporateur rotatif Eral et l'extrait sec repris par 0,4 ml de chloroforme. Les stéroïdes ont été séparés par chromatographie descendante dans le système de solvants benzène-méthanol-eau (100.50.50) à 30° C. Ils ont été élués par de l'éthanol absolu et dosés suivant la technique de A. Gornall et M. Mac Donald.

Nous avons indiqué dans le tableau XV, les poids des surrénales et les quantités d'ACTH utilisées.

Les résultats obtenus montrent que l'addition de corticostimuline au liquide de Krebs accroît à des degrés divers la sécrétion de tous les stéroïdes surrénaliens. L'augmentation du stéroïde X_3 et de la corticostérone est particulièrement élevée

TABLEAU XV.

Lots de rats	Poids des surrénales en mg/paire	Quantités d'ACTH ajoutées dans le milieu en mg	Volume du liquide de Krebs
Rats normaux			
Lot 1	38 + 29 = 67	13,4	3 ml
	28 + 25 = 53	10,6	3 ml
Lot 2	24 + 42 = 66	13,2	3 ml
	36 + 35 = 71	14,2	3 ml
Rats thyroïdectomisés			
Lot 1	27 + 42 = 69	13,8	3 ml
	27 + 24 = 51	10,2	3 ml
Lot 2	26 + 29 = 55	11,0	3 ml
	30 + 30 = 60	12,0	3 ml

puisqu'ils représentent à eux seuls, près de la moitié des stéroïdes totaux (Tableau XVI et Fig. 19). Celle des stéroïdes X_1, X_2 et de la 11-déhydrocorticostérone est moins frappante, bien que leurs taux soient nettement supérieurs à ceux obtenus en l'absence d'A C T H.

TABLEAU XVI.

Taux des différents stéroïdes libérés in vitro par les surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés en présence d'A C T H (Choay) (en µg/1 g de surrénales).

Stéroïdes	Rats thyroïdectomisés		Rats normaux	
	Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
$X_1 + X_2$	29	66	78	123
Aldostérone	76	50	78	68
X_3 + corticostérone	131	116	233	214
11-déhydrocorticostérone	38	25	50	76
Total	274	257	439	481

La libération de l'aldostérone elle-même est accrue. Elle est incontestablement influencée par l'hormone pré-hypophysaire. Sur ce point, les résultats obtenus par certains auteurs sont discordants. Quelques-uns ont cru déceler une certaine auto-

nomie de l'aldostérone vis-à-vis de la corticostimuline. Ils placent sa production sous le contrôle direct de l'hypothalamus [72 et 73]. En fait, elle n'échappe pas à l'action stimulante de l'hormone corticotrope. Son accroissement limité tient sans doute à la faible quantité de 18-hydroxylase présente dans les cellules de la corticosurrénale [74]. Celle-ci représente, en fait, le seul facteur limitatif. L'étude des rapports A C T H-Aldostérone dépasse, certes, le cadre de nos recherches. Nous avons tenu, néanmoins à souligner au passage les effets de la corticotrophine sur la formation de l'hormone minéralotrope.

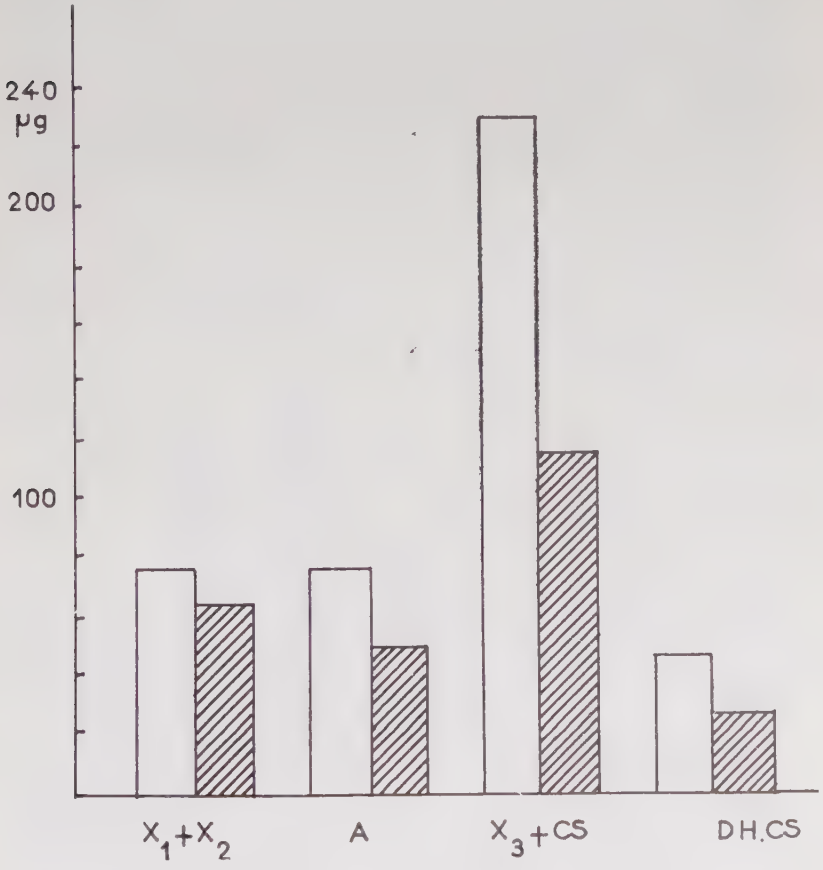


Fig. 19. — Taux des différents corticostéroïdes libérés *in vitro* en présence d'A C T H par des surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés.

Corticostéroïdes libérés par des surrénales de rats normaux.

Corticostéroïdes libérés par des surrénales de rats thyroïdectomisés.

Ces remarques générales sont valables pour les surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés. Il existe cependant une différence fondamentale entre les deux expériences. La réponse des surrénales des rats thyréoprives à l'A C T H est en effet, moins intense que celle des animaux témoins. Comme l'indiquent les dosages des stéroïdes, elle est quantitativement très différente (Tableau XVI). Chez les animaux thyroïdectomisés, leur taux est inférieur de 40 p. 100 environ à celui des rats normaux. Leur production est, certes, accrue, mais elle demeure en dessous de celle des animaux normaux, ce qui met en lumière l'activité réduite des surrénales après thyroïdectomie

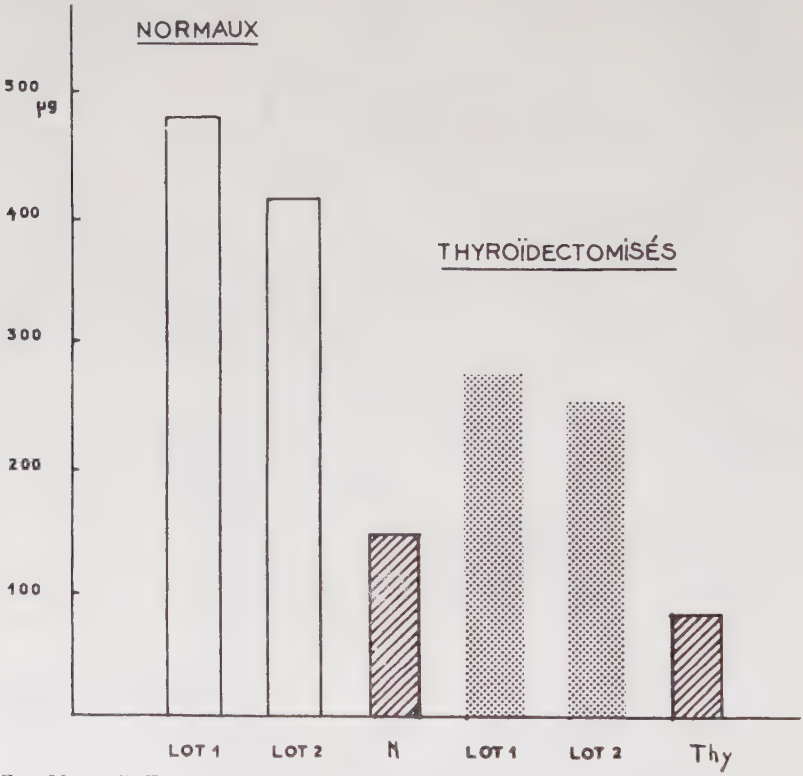


Fig. 20. — 1) Taux des corticostéroïdes totaux libérés *in vitro en présence d'A C T H* par des surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés.

Taux des corticostéroïdes libérés par des surrénales de rats normaux.

Taux des corticostéroïdes libérés par des surrénales de rats thyroïdectomisés.

2) Taux des corticostéroïdes libérés *in vitro sans A C T H*
N = par des surrénales de rats normaux.
Thy = par des surrénales de rats thyroïdectomisés.

et la diminution de leur sensibilité à l'action de l'A C T H (fig. 19 et 20). Ces résultats sont analogues à ceux de K. Eik-Nes et K. Brizzee qui ont observé une augmentation de 17-hydroxy-corticostéroïdes plasmatiques chez le chien thyroïdectomisé après injection de corticotrophine. Toutefois, l'élévation était inférieure de 50 p. 100 environ à celle des animaux témoins ayant reçu une dose identique d'hormone hypophysaire [15].

Nos expériences confirment l'hypocorticisme des surrénales des rats thyréoprives. Elles ont, à notre avis, un intérêt particulier parce qu'elles tendent à montrer que l'hypothèse de M. et I. Zarrow ne peut, à elle seule, expliquer le ralentissement de l'hormonogénèse surrénalienne du rat thyroïdectomisé. Certes, la corticostimuline constitue un facteur essentiel de l'activité de la corticosurrénale. Il n'était donc pas illogique de penser qu'un affaiblissement progressif de sa sécrétion endogène puisse engendrer une hyposécrétion des stéroïdes. Encore faudrait-il démontrer par des dosages précis que le taux de l'hormone corticotrope, est inférieur, à ce qu'il est normalement, chez l'animal thyroïdectomisé. De plus, étant donné le rôle précis que l'on attribue à cette hormone et qui consiste à promouvoir la transformation du cholestérol en prégnénolone, on peut penser qu'elle n'affecte ni le potentiel sécrétoire des surrénales, ni leur équipement enzymatique. Elle régularise, en définitive, la sécrétion des corticostéroïdes suivant les besoins de l'organisme.

On pouvait donc attendre des surrénales isolées de rats thyroïdectomisés qu'elles répondent normalement aux sollicitations de doses élevées d'A C T H. En fait, il en va tout autrement. Cette constatation est d'autant plus surprenante que tous les facteurs semblaient réunis au cours de nos expériences pour obtenir une réponse favorable. On a, en effet, remarqué depuis longtemps l'accumulation du cholestérol dans les surrénales d'animaux thyroïdectomisés. Elle procède en partie, du ralentissement de la corticoïdogénèse. Aussi pouvait-on espérer, en raison du taux élevé du cholestérol surrénalien, d'une part, et de l'excès d'A C T H et d'oxygène présents dans le milieu d'incubation d'autre part, un rétablissement de la biogénèse des stéroïdes. Les résultats obtenus vont à l'encontre de cette attente. Ils permettent d'entrevoir, d'ores et déjà, l'existence de certains mécanismes susceptibles de bloquer en partie la corticoïdogénèse et de limiter l'action de l'A C T H chez l'animal thyroïdectomisé. L'hypothèse d'une participation éventuelle des hormones thyroïdiennes à la formation des corticostéroïdes se trouve en même temps renforcée.

II. — ÉTUDE DE LA SÉCRÉTION HYPOPHYSAIRE DE L'HORMONE CORTICOTROPE CHEZ LE RAT NORMAL, THYROIDECTOMISÉ ET TRAITÉ PAR T_3 ET T_4.

Il n'est pas toujours aisé de définir les mécanismes qui régissent les interrelations glandulaires, souvent en raison des multiples facteurs qui y participent. Tel est le cas notamment des relations thyro-corticosurrénaliennes. L'activité réduite des surrénales d'animaux thyréoprives, a, certes, été attribuée à un défaut d'A C T H. C'est là l'hypothèse qui semble réunir le plus grand nombre de suffrages. M. et I. Zarrow l'ont adoptée en attribuant l'inhibition de la sécrétion d'hormone corticotrope à une hyperproduction de thyréostimuline. L'hyposécrétion de corticostimuline demeure l'explication généralement admise, mais cette conception, bien que plausible, méritait cependant d'être vérifiée. Elle devait nous conduire à évaluer la teneur en hormone corticotrope de l'hypophyse du rat thyroïdectomisé.

Une telle entreprise ne semblait pas à priori impossible à mener à bien. Diverses techniques de dosage de l'hormone corticotrope ont été proposées, elles sont toutes basées sur le degré de stimulation qu'elle exerce sur le cortex surrénal. L'activité biologique de l'A C T H peut être alors appréciée par les modifications pondérales, structurales ou biochimiques de la glande. Les tests biologiques reposent sur les variations histologiques ou histochimiques de celle-ci ; les méthodes chimiques font appel aux dosages de constituants corticaux : cholestérol ou acide ascorbique. Certains tests manquent malheureusement de sensibilité et de spécificité. Tel est le cas notamment de ceux qui utilisent l'accroissement pondéral des glandes ou leurs modifications cytochimiques. Par contre, les taux du cholestérol ou de l'acide ascorbique surrénaliens reflètent plus quantitativement l'activité de la corticosurrénale, car ils dépendent de l'activité corticotrope de l'hypophyse ; ils permettent, en outre, une appréciation beaucoup plus sélective de cette dernière. Ils ne sont pas toutefois, d'une utilisation très facile, car ils doivent être exécutés sur des animaux parfaitement sélectionnés et préalablement hypophysectomisés ; aussi nous sommes nous demandés s'il n'était pas possible de réaliser un test plus simple, mais néanmoins spécifique. L'expérience acquise au cours de ce travail, nous a permis d'envisager d'emblée, une méthode basée sur les variations de la sécré-

tion des corticostéroïdes *in vitro*. La technique mise au point repose sur le principe d'une action directe des hormones hypophysaires sur les surrénales. Nous en décrirons les modalités et les applications.

A. — Description de la méthode de dosage de l'ACTH.

1) Principe. — Il est basé essentiellement sur une stimulation directe de la corticoïdogénèse par l'hypophyse du rat. Elle comporte trois temps :

a) — Incubation des hypophyses isolées dans du liquide de Krebs, au cours de laquelle les glandes sécrètent l'hormone corticotrope.

b) — Action de la corticostimuline sur des surrénales isolées, maintenues à 37° C.

c) — Dosage des corticostéroïdes libérés par ces organes sous l'effet de la stimuline hypophysaire.

2) Technique. — Toutes nos expériences ont été réalisées sur des organes de rats mâles adultes placés dans un local isolé maintenu à 20°C. et ayant à leur disposition une nourriture standard et de l'eau de boisson à volonté. Afin d'éviter tout stress, au cours du transport au laboratoire, les hypophyses ont été prélevées dans l'animalerie.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation et les hypophyses sont immédiatement extirpées. Elles sont placées dans du liquide de Krebs, à 37° C en attendant d'être mises en incubation. Nous utilisons quatre hypophyses par expérience. Chaque glande est coupée, aux ciseaux fins, en quatre quartiers. Les seize fragments sont placés dans une fiole renfermant 3 ml de liquide de Krebs et mises à incuber à 37° C. en présence d'oxygène et sous agitation pendant deux heures. L'appareil utilisé est celui décrit précédemment (fig. 1).

Quatre paires de surrénales de rat sont par ailleurs simultanément prélevées sous anesthésie. Après avoir été rapidement nettoyées, elles sont pesées et découpées chacune en quatre quartiers. Les glandes sont placées dans une fiole renfermant 3 ml de solution de Krebs. Le flacon est monté sur l'incubateur et relié à la source d'oxygène. Les surrénales sont maintenues à 37° C et sous agitation pendant 30 minutes. Nous avons employé quatre paires de surrénales et quatre hypophyses dans tous nos essais.

La fin de la période d'incubation des hypophyses doit correspondre à l'expiration du temps de préincubation des surrénales. Il est donc nécessaire de respecter un horaire rigoureux. Les hypophyses sont éliminées de leur milieu d'incubation à la fin de cette première période de l'expérience et l'on introduit les surrénales préalablement incubées. Celles-ci sont maintenues dans le liquide d'où l'on a éliminé les hypophyses, pendant 2 heures, sous oxygène et agitation permanente. L'hormone corticotrope sécrétée par les hypophyses agit alors sur le cortex surrénalien pour stimuler la corticoïdogénèse.

Les corticostéroïdes libérés sont ensuite extraits par addition au liquide de Krebs de 3 ml de chloroforme (Merk). Après agitation manuelle de 5 minutes, l'extrait chloroformique est siphonné et l'on procède à une seconde extraction. Les solutions chloroformiques placées dans un petit tube à essai sont évaporées à sec, sous pression réduite, au moyen d'un évaporateur rotatif.

3) Résultats — a) *qualitatifs.* — Un certain nombre de chromatogrammes ont été réalisés pour contrôler la validité de cette technique (papier Whatman n° 1, chromatographie descendante à 30° C dans le solvant habituel : benzène-méthanol-eau 100-50-50). Les stéroïdes ont été révélés par pulvérisation d'une solution de bleu de tétrazolium suivie de séchage à 70° C pour permettre l'étude de leur fluorescence en lumière de Wood.

Les documents obtenus justifient le principe de cette technique (fig. 21 et 22). En effet, après révélation au bleu de tétrazolium on constate une augmentation considérable des stéroïdes sécrétés par les surrénales sous l'action de la corticostimuline hypophysaire. Les taux des stéroïdes X_2 et X_3, de la corticostérone et de l'aldostérone sont très nettement supérieurs à ceux obtenus à partir des surrénales témoins (fig. 21). Seule la 11-déhydrocorticostérone n'est que très faiblement augmentée. L'examen ultra-violet des chromatogrammes confirme ces résultats. L'accroissement des corticostéroïdes libérés par les surrénales se traduit par une augmentation de l'intensité de la fluorescence particulièrement remarquable (fig. 21). Les mesures de l'absorption à 253 mμ des corticostéroïdes séparés par chromatographie nous ont permis de concrétiser celui-ci (fig. 22).

b) *Quantitatifs.* — Il y avait lieu d'étudier le taux des corticostéroïdes libérés par les surrénales après stimulation par

l'A C T H endogène en dosant ceux-ci. Des hypophyses ont été incubées par lot de quatre, dans 3 ml de solution de Krebs, à 37° C sous oxygène pendant 2 heures. Après une préincubation de 30 minutes, des surrénales (4 paires par expérience) ont été ajoutées dans le milieu d'incubation des hypophyses et

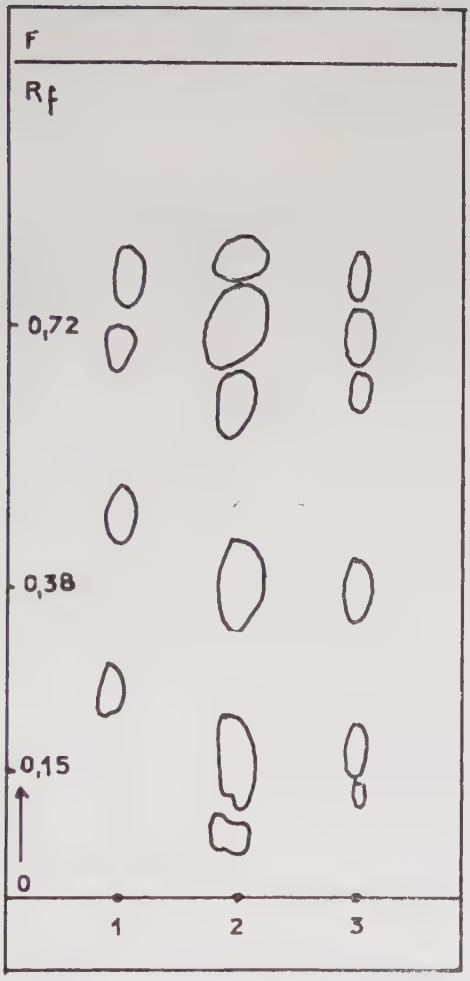


Fig. 21. — Chromatogramme des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rats normaux.

1 = Stéroïdes de référence.

2 = Corticostéroïdes libérés sous l'influence de la corticostimuline hypophysaire du rat.

3 = Corticostéroïdes sécrétés par des surrénales témoins.

Chromatographie descendante. Papier Whatman 1.
Solvant : Benzène-Méthanol-eau (100.50.50).T. = 30° C.

maintenues à 37° C en présence d'O_2, pendant 120 minutes. Les stéroïdes libérés ont été extraits par du chloroforme. Le résidu d'évaporation de ce dernier est repris par 1 ml de méthanol. Les dosages sont effectués suivant la technique de A. Gornall et M. Mac Donald, sur 0,5 ml de solution méthanolique. Des essais témoins ont été exécutés dans le même temps avec des

Fig. 22. — Courbes d'absorption à 253 mμ des corticostéroïdes libérés *in vitro* par des surrénales de rats normaux et séparés par chromatographie descendante dans le système de solvants : Benzène-Méthanol-eau (100.50.50).

1) Corticostéroïdes sécrétés sous l'action de la corticostimuline endogène.

2) Corticostéroïdes libérés par des surrénales témoins.

lots de quatre paires de surrénales, incubées pendant deux heures dans 3 ml de liquide de Krebs exempt de corticostimuline. Les résultats sont exprimés dans le Tableau XVII.

TABLEAU XVII.

Données diverses	Surrénales témoins		Surrénales + hypophyses	
	Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
Nombre d'hypophyses	0	0	4	4
Nombre de paires de surrénales	4	4	4	4
Poids des surrénales	111 mg	117 mg	125 mg	112 mg
Volume du liquide de Krebs	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Durée de l'incubation	2 h	2 h	2 h	2 h
Taux des stéroïdes				
μg/1 g surrénales	130	145	360	374

Ces résultats confirment et précisent les données chromatographiques antérieures. L'augmentation des stéroïdes sécrétés sous l'influence de l'hormone corticotrope est significative, puisqu'elle est environ 2,5 fois supérieure à l'excrétion des corticostéroïdes par les glandes témoins. Cette élévation est en accord avec les conclusions de G. Pincus qui a observé un accroissement de 2-3 fois de la production des stéroïdes après

addition d'A C T H commerciale au milieu d'incubation de coupes de tissu surrénal [74].

4) Discussion des résultats. — Lorsque le cortex surrénal est soumis à l'anté-hypophyse, il se manifeste un rapport étroit entre la corticoïdogénèse et l'hormone corticotrope *in vitro* sur lequel repose l'adoption d'une méthode de dosage de l'hormone corticotrope. Un tel projet comportait certaines inconnues. Il importait, en effet, de savoir tout d'abord, si l'hypophyse est capable de libérer *in vitro* la corticostimuline en quantité suffisante pour provoquer une augmentation substantielle et significative de la corticoïdogénèse. Les chromatogrammes et les dosages ont montré qu'il en est bien ainsi. L'hypophyse isolée conserve ses propriétés. L'A C T H qu'elle libère *in vitro* est en proportion telle qu'elle assure une production optimum des corticostéroïdes. Ces résultats ont permis d'envisager l'évaluation de la sécrétion hypophysaire de la corticostimuline chez le rat thyroïdectomisé et traité par les iodothyronines.

L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle est d'une exécution assez simple, et qu'elle est effectuée sur des surrénales d'animaux normaux. La difficulté que représente l'utilisation de rats hypophysectomisés se trouve ainsi supprimée. En outre, l'appréciation de l'activité corticotrope hypophysaire est basée sur les propriétés essentielles de la corticostimuline. Sa teneur est évaluée en fonction des variations de la corticoïdogénèse qu'elle a pour mission de stimuler. Il n'y a donc pas à craindre l'interférence des autres hormones hypophysaires. Tel n'est pas le cas du test de M. Simpson, H. Evans, et C. Li fondé sur le maintien du poids des surrénales des animaux hypophysectomisés. D. Cater et M. Stack Dunne ont montré, en effet qu'il pouvait être influencé par l'hormone somatotrope [75].

En raison de sa spécificité, la technique mise au point évite l'extraction de la corticostimuline, sa séparation des autres stimulines et sa purification. Ces opérations longues et délicates exigent un soin minutieux afin d'exclure les risques de dénaturation liées à la nature polypeptidique de cette hormone.

Il est enfin possible de calculer, d'après le taux des stéroïdes surrénaliens, la teneur de l'hypophyse en hormone corticotrope, par référence à une courbe étalon préalablement établie à partir de préparations commerciales d'A C T H.

B. — Etude de la sécrétion *in vitro* des corticostéroïdes par les surrénales du rat en présence de doses variées d'ACTH (Choay).

M. Saffran et A. Schally ont indiqué au cours de leurs essais de dosage *in vitro* des préparations commerciales d'A C T H que la réponse des surrénales est proportionnelle à la quantité de corticostimuline pour des doses comprises entre 10 et 300 mu pour 100 mg de tissu surrénal [20]. Nous avons néanmoins tenu à étudier la réactivité des surrénales après addition de doses variées d'hormone corticotrope et cela pour diverses raisons. Notre méthode d'incubation *in vitro*, les procédés d'extraction et le dosage des stéroïdes ne correspondent pas à ceux utilisés par M. Saffran et A. Schally. Les préparations commerciales d'A C T H et la souche des animaux diffèrent également. Il était par conséquent souhaitable de définir la sensibilité des surrénales de nos animaux vis-à-vis de l'A C T H dans nos conditions expérimentales. L'établissement d'une courbe d'étalonnage était, en outre, indispensable pour déterminer le taux de la corticostimuline sécrétée par l'hypophyse des rats thyroïdectomisés et traités par les hormones thyroïdiennes.

Toutes nos expériences ont été effectuées avec des surrénales de rats mâles normaux et une préparation commerciale d'A C T H (Choay). Quatre paires de surrénales, coupées en quartiers sont utilisées à chaque essai. Après une préincubation de 30 minutes à 37° C sous oxygène, le liquide de Krebs est éliminé et remplacé par 3 ml de solution de Krebs renfermant l'A C T H préalablement dissous dans le même milieu. La durée de l'incubation proprement dite est de 2 heures. Les dosages des stéroïdes sont effectués selon la technique de A. Gornall et M. Mac Donald après reprise de l'extrait sec par 1 ml de méthanol, et division de la solution méthylique en deux parties. Le poids des surrénales, les quantités d'A C T H utilisées à chaque essai, sont indiqués dans le tableau XVIII ainsi que les taux des corticostéroïdes.

Nos résultats sont, dans l'ensemble, identiques à ceux de M. Saffran et A. Schally. La production des corticostéroïdes est grossièrement proportionnelle à la quantité d'hormone stimulante ajoutée au milieu d'incubation pour des doses comprises entre 0,020 et 0,500 U.I. (fig. 23). Au delà, on constate une certaine saturation ; la capacité des surrénales à augmenter leur sécrétion est dépassée. L'activité de la corticostimuline

TABLEAU XVIII.

N° des essais	Poids des surrénales (4 paires) en mg	ACTH en U I (Choay)	ACTH en U I pour 100 mg de glandes	Corticostéroïdes libérés en 2 h µg/1 g surrénales
1	118	0	0	155
2	120	0,01	0,008	158
3	114	0,02	0,017	175
4	140	0,05	0,035	242
5	128	0,07	0,054	304
6	103	0,12	0,11	407
7	108	0,25	0,23	444
8	106	0,50	0,47	547
9	110	0,75	0,68	581
10	113	1,0	0,88	495

se trouve vraisemblablement limitée par la teneur du cortex en cholestérol et en enzymes tels que la 21-desmolase, responsable de la coupure de la chaîne latérale de ce stérol entre les carbones 20 et 22. On peut, néanmoins, souligner la sensibilité de la méthode, puisque 0,035 U.I. d'A C T H, soit 35 µg, provoquent une augmentation substantielle du taux des stéroïdes.

Seul, l'état fonctionnel des surrénales demeure une inconnue. Il est certain que, d'un animal à l'autre, les différences

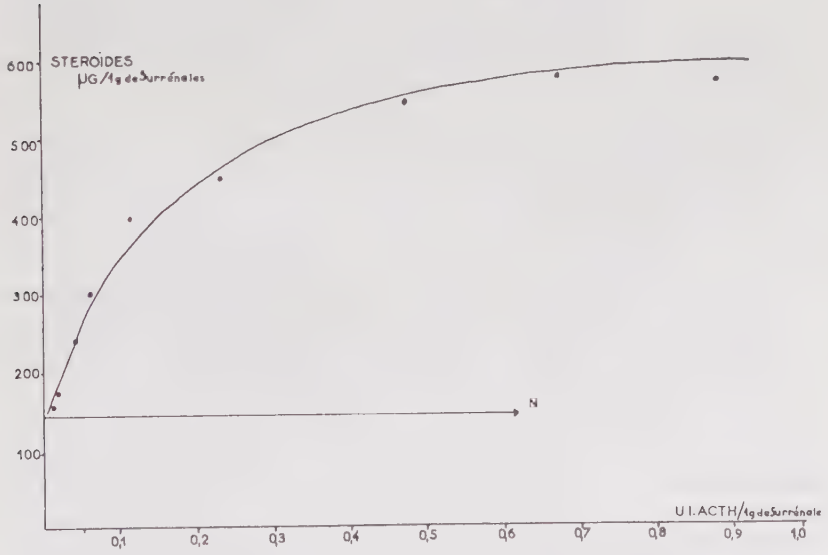


Fig. 23. — Variations du taux des corticostéroïdes sécrétés *in vitro* en présence de quantités variées d'A C T H.

non négligeables sont possibles et qu'il est difficile de les prévoir. L'utilisation d'animaux sélectionnés pourrait, il est vrai, réduire ce risque, d'ailleurs inhérent à tous les dosages biologiques. L'appréciation de l'activité corticosurrénale basée sur les variations du cholestérol ou de l'acide ascorbique n'en est pas exempte.

C. — Etude de l'activité corticotrope hypophysaire des rats normaux, thyroïdectomisés et traités par les iodothyronines.

La mise au point d'une technique d'évaluation de l'activité corticotrope de l'hypophyse, les variations de la corticoïdogénèse en fonction du taux de l'A C T H rendaient possible la réalisation de notre projet de dosage de la corticostimuline chez le rat thyréoprive et traité par la thyroxine ou la 3.5.3'-triiodothyronine. Nous avons utilisé des rats mâles de 60 g environ, radiothyroïdectomisés par injection intra-péritonéale de 300 µc d'^{131} I et divisés en 3 lots :

— LOT 1 : 24 rats thyroïdectomisés, sacrifiés un mois après la destruction des thyroïdes.

— LOT 2 : 8 rats thyroïdectomisés, traités 30 jours après thyroïdectomie, par injection intra-péritonéale quotidienne de 9 µg de L-T_3 pendant 10 jours.

— LOT 3 : 8 rats thyroïdectomisés, traités dans les mêmes conditions par 18 µg de L-T_4.

Le protocole expérimental a été le même pour les différents lots. Les hypophyses ont été prélevées après décapitation, et mises à incuber par quatre dans 3 ml de liquide de Krebs, à 37°C, en présence d'oxygène pendant 2 heures. Elles ont ensuite été remplacées par quatre paires de surrénales de rats normaux préalablement incubées. Celles-ci ont été maintenues à 37° C sous oxygène pendant 2 heures dans le milieu d'incubation des hypophyses. Les corticostéroïdes libérés ont été dosés suivant la technique de A. Gornall et M. Mac Donald.

1) Résultats. — a) *Rats thyroïdectomisés.* — Les dosages des corticostéroïdes libérés par des surrénales de rats normaux sous l'influence de l'hormone corticotrope provenant d'hypophyses de rats normaux ou thyroïdectomisés font apparaître certaines différences (Tableau XIX). L'hypophyse du rat thyroïdectomisé sécrète plus de corticostimuline que celle de l'ani-

mal normal, comme en témoigne le taux des stéroïdes (Tableau XIX). La thyroïdectomie provoque, en fait, une hypersécrétion modérée d'hormone corticotrope.

TABLEAU XIX.

Taux des corticostéroïdes libérés in vitro en deux heures par des surrénales de rats normaux, sous l'influence de corticostimuline provenant d'hypophyses de rats normaux et thyroïdectomisés (µg/1 g de surrénales).

Essais n°	Taux des stéroïdes libérés sous l'influence d'hypophyses de rats normaux	Taux des stéroïdes libérés sous l'influence d'hypophyses de rats thyroïdectomisés
1	420	421
2	388	425
3	350	340
4	392	414
5	457	505
6	412	428
Taux moyen ..	403	422

Ainsi, contrairement à l'opinion généralement répandue, l'ablation du corps thyroïde augmente l'activité corticotrope de l'hypophyse. Cette constatation n'est pas à priori paradoxale. Sa signification sera discutée ultérieurement.

Signalons, en outre, l'hypertrophie des hypophyses des rats thyroïdectomisés. Nous avons déterminé le poids de ces glandes, par lots de quatre, après dessiccation sous vide en présence de $P_2 O_5$. Les poids moyens calculés à partir de huit lots de quatre glandes sont les suivants : hypophyses de rats normaux 2,2 mg, de rats thyroïdectomisés 3,1 mg. L'augmentation pondérale des glandes des animaux thyréoprives, évidente, avait déjà été signalée par H. Selye en 1953 [69].

b) *Rats thyroïdectomisés, traités par L-T_3 et L-T_4.*

Un mois après la radiothyroïdectomie deux lots de huit rats chacun ont été constitués. Les animaux du 1er lot, ont reçu quotidiennement par voie intrapéritonéale 9 µg de L-3.5.3'-triiodothyronine pendant 10 jours, ceux du 2e lot, 18 µg de L-3.5.3.'5 :tétraiodothyronine. A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés, et leurs hypophyses prélevées pour doser leur teneur en hormone corticotrope. Nous avons, en même temps, procédé à l'ablation des surrénales pour mesurer leur activité.

La teneur de l'hypophyse en corticostimuline a été déterminée selon notre technique. Comme on peut le constater l'administration d'iodothyronines réduit l'hypersécrétion de cette hormone (tableau XX). L'activité corticotrope hypophysaire tend à redevenir normale. Il était donc, particulièrement intéressant de mesurer la sécrétion corticosurrénale de ces animaux. Le taux des corticostéroïdes libérés en 3 heures, sont indiqués dans le tableau XX. Il est incontestable que l'injection quotidienne de 9 µg de L-T_3 ou de 18 µg de L-T_4 pendant

TABLEAU XX.

Taux des corticostéroïdes sécrétés en deux heures par des surrénales de rats normaux, sous l'influence de la corticostimuline libérée par l'hypophyse de rats traités par L-T_3 et L-T_4 (µg/1 g de surrénales).

Lots	L-T_3	L-T_4	Thyroïdectomisés (taux moyen)	Normaux (taux moyen)
Lot 1....	420	340	422	403
Lot 2....	333	372		

Taux des corticostéroïdes libérés en trois heures par des surrénales de rats traités par L-T_3 et L-T_4 (µg/1 g de surrénales)

Lots	L-T_3	L-T_4	Thyroïdectomisés	Normaux
Lot 1....	137	156	105	160
Lot 2....	141	120		

10 jours, fait regresser l'hypocorticisme de l'animal thyroïdectomisé. Les surrénales de ces animaux sont en effet, capables d'améliorer leur corticoïdogénèse. Les quantités de stéroïdes sécrétés sont voisines des valeurs normales. Elles sont supérieures à celles que nous avions obtenues après administration d'iodothyronine à doses physiologiques (cf. tableau IX), comme le prévoyait l'hypothèse que nous avons émise, quant à la nécessité d'utiliser une posologie supérieure à la sécrétion endogène thyroïdienne pour restaurer la corticoïdogénèse du rat thyroïdectomisé. Il faut, d'ailleurs, remarquer que cette restauration correspond à une activité hypophysaire corticotrope apparemment normale. Il y a donc, chez les animaux traités un certain équilibre entre les sécrétions pituitaire et corticosurrénalienne.

2) Discussion des résultats. — Nos recherches sur le mode d'intervention des hormones thyroïdiennes dans la corticoïdogénèse devaient nécessairement aboutir à l'étude de l'activité corticotrope de l'hypophyse du rat thyroïdectomisé ou soumis à un traitement par les iodothyronines. La mise au point d'une méthode permettant d'apprécier le taux de la corticostimuline hypophysaire a tout d'abord été réalisée. Dans sa forme actuelle elle possède davantage les caractères d'un test biologique que ceux d'une technique de dosage proprement dit. Malgré ses imperfections, elle nous paraît susceptible d'améliorations, et il est possible que l'on puisse en accroître le rendement et la sensibilité. Quoiqu'il en soit, elle nous a permis de mesurer les variations de l'A C T H chez nos animaux.

Après la radiothyroïdectomie une légère augmentation d'hormone corticotrope a été mise en évidence. Cette constatation, assez surprenante, va à l'encontre de ce que l'on a jusqu'ici généralement admis. En fait, nos résultats ne sont cependant pas aussi paradoxaux qu'ils le paraissent à première vue, car l'équilibre endocrinien résulte de l'interaction des stimulines pré-hypophysaires et des sécrétions élaborées par leurs récepteurs glandulaires. Les hormones anté-hypophysaires stimulent l'activité fonctionnelle des glandes réceptrices qui interviennent à leur tour pour régulariser la sécrétion des stimulines correspondantes. C'est ainsi que la corticostimuline et la thyréostimuline contrôlent respectivement l'activité de la corticosurrénale et du corps thyroïde. En retour, le taux sanguin des corticostéroïdes et des hormones thyroïdiennes régit la sécrétion des hormones hypophysaires. Les corrélations hypophyso-endocrines sont donc dominées par cette notion de réciprocité.

On sait que la thyroïdectomie, entraîne une hypersécrétion d'hormone thyréotrope comme A. Contopoulos, M. Simpson et A. Koueff, l'ont encore récemment démontré [76]. De même la surrénalectomie unilatérale accroît la libération d'A C T H et des expériences de parabiose ont prouvé que l'ablation des surrénales stimule l'excrétion de l'hormone corticotrope [77]. En effet, lorsqu'un rat surrénalectomisé est associé à un partenaire hypophysectomisé porteur de ses surrénales, on constate une hypertrophie des surrénales du rat hypophysoprive. L'effondrement du taux des corticostéroïdes sanguins provoque donc une hypersécrétion d'A C T H et il est probable qu'il en est ainsi après thyroïdectomie. Nous avons en effet, constaté après ablation du corps thyroïde des signes très nets

d'hypocorticisme surrénalien, comme en témoignent l'abaissement marqué de la production des corticostéroïdes et les modifications de l'équilibre hydrominéral. On pouvait, dès lors, envisager un accroissement de la sécrétion d'A C T H. Nos résultats ont confirmé cette hypothèse, puisque nous avons observé une augmentation de l'activité corticotrope de l'hypophyse du rat thyroïdectomisé. L'explication est simple. L'hypocorticisme du rat thyroïdectomisé entraîne une diminution des corticostéroïdes plasmatiques dont le taux devient insuffisant pour freiner la sécrétion hypophysaire de la corticostimuline. Il en résulte une hypersécrétion d'A C T H, laquelle doit être considérée, en retour, comme une tentative de réduction de l'hypocorticisme et de la corticoïdogénèse défaillante. Elle apparaît ainsi comme un moyen de défense de l'organisme.

L'administration de L-T_4 ou de L-T_3 aux doses respectives de 18 µg et 9 µg freine l'activité corticotrope hypophysaire du rat thyroïdectomisé. Cette constatation milite également en faveur d'une hypersécrétion d'hormone corticotrope après destruction du corps thyroïde. L'étude des variations de l'acide ascorbique surrénalien après injection de T_3 ou de T_4 est conforme à nos résultats. D. Wallach et E. Reineke [12], P. Timiras et D. Woodbury [14] ont, en effet, obtenu une baisse rapide et passagère de l'ascorbie surrénalienne après administration d'iodothyronines. Celle-ci s'annule par la suite et la prolongation du traitement entraîne une élévation du taux de l'acide ascorbique. La thyroxine et la 3.5.3:-triiodothyronine provoque donc un accroissement de la corticoïdogénèse, qui freine, en retour, la sécrétion hypophysaire de la corticostimuline.

De leur côté, R. Michel, H. Tron-Loisel et R. Truchot ont cherché à déterminer l'influence des états thyroïdiens sur l'élaboration de la corticotrophine hypophysaire, matérialisée par le dosage de l'ascorbie surrénalienne [78 et 79]. Ils ont conclu qu'il existe une certaine dépendance dans la sécrétion hypophysaire de l'A C T H et de la T S H. Lorsque l'excrétion de la thyréostimuline est considérablement augmentée après thyroïdectomie, il résulte une légère stimulation de la corticostimuline.

On peut, en outre, tirer argument de la localisation cytologique de l'A C T H. Celle-ci est en effet élaborée par les cellules basophiles de l'anté-hypophyse, lesquelles assurent la formation et la production de l'hormone thyréotrope. Il est donc vraisemblable que l'hypersécrétion de thyréostimuline qui suit

la thyroïdectomie s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'A C T H.

Les résultats obtenus avec les hypophyses de rats thyroïdectomisés ou traités par les iodothyronines sont donc contraires à l'hypothèse de M. et I. Zarrow. L'atrophie des surrénales, l'abaissement des 17-hydroxycorticostéroïdes sanguins de l'animal thyréoprive ne sont pas imputables à un défaut de sécrétion de l'ACTH. Celle-ci est au contraire semble-t-il accrue. Cette augmentation est d'ailleurs conforme à l'exercice des mécanismes généraux qui règlent les corrélations hypophyso-endocrines.

III. — ACTION DE L'HORMONE SOMATOTROPE (STH) SEULE OU ASSOCIÉE A LA THYROXINE (T_4) SUR LE DÉVELOPPEMENT PONDÉRAL DES SURRÉNALES ET SUR LA CORTICOIDOGÉNÈSE.

L'hormone corticotrope produit incontestablement une augmentation du poids des surrénales servant de base à la technique de dosage de l'ACTH proposée par M. Simpson, H. Evans et C. Li [80]. Il n'en reste pas moins vrai qu'elle ne représente pas la seule hormone susceptible de provoquer l'accroissement pondéral de ces glandes. Nous avons déjà signalé les résultats de H. Evans, M. Simpson et R. Pencharz concernant l'augmentation de poids des surrénales d'animaux traités par l'hormone somatotrope et la thyroxine [3], résultats confirmés par ceux de R. Scow, M. Simpson et coll. [4]. Les observations de P. Bois et H. Selye sont encore plus significatives. Etudiant l'action synergique de l'hormone de croissance et de T_4 ou de l'ACTH et de la thyroxine sur le développement pondéral des surrénales, ces auteurs concluent que l'hormone thyroïdienne accroît considérablement les effets de l'hormone somatotrope, mais non ceux de la corticostimuline [71]. On peut donc se demander si les modifications de poids des surrénales d'animaux thyroïdectomisés ne sont pas imputables à l'absence de sécrétion des hormones somatotrope et thyroïdiennes. Il n'est, d'ailleurs, pas douteux que l'ablation des glandes thyroïdes provoque une hyposécrétion de l'hormone de croissance [76]. Ceci nous a conduit à étudier les effets de la somatostimuline seule ou associée à la thyroxine sur le poids des surrénales de rats thyroïdectomisés. Nous avons surtout recherché les

possibilités d'une amélioration secondaire de la corticoïdogénèse.

Trente rats radiothyroïdectomisés depuis cinq semaines ont été répartis en deux lots. Les animaux du premier ont reçu chacun 5 unités Evans de somatostimuline par voie intramusculaire, ceux du second 5 µg de L-T_4 par voie intrapéritonéale et 5 Unités Evans en intramusculaire. Les injections ont été poursuivies pendant 12 jours. Les rats ont été pesés avant et après l'expérimentation. Leurs surrénales ont été prélevées sous anesthésie, pesées et mises à incuber par quatre dans 3 ml de Krebs à 37°C sous oxygène pendant 3 heures. Les corticostéroïdes libérés ont été dosés par la méthode de A. Gornall et M. Mac Donald.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI.

Effets de la somatostimuline seule ou en association avec la Thyroxine chez des rats thyroïdectomisés.

Données diverses	Rats traités par STH	Rats traités par STH + T_4	Témoins thyroïdectomisés	Témoins normaux
Poids corporel				
Taux moyen en g :				
avant traitement	83	85	75	100
après traitement	109 + 26	123 + 38	84 + 9	134 + 34
Poids des surrénales				
Taux moyen en mg/paire.	27	33	20	28
Taux des corticostéroïdes				
Taux moyen µg/ 1 g de surrénale	120	133	105	180

L'administration quotidienne de 5 Unités Evans de somatostimuline par voie intramusculaire pendant douze jours, permet un gain de poids supérieur à celui observé chez les animaux témoins thyroïdectomisés pendant le même laps de temps. Toutefois, l'effet le plus caractéristique concerne les surrénales puisque l'hormone somatotrope supprime l'atrophie surrénalienne consécutive à la thyroïdectomie. Les résultats obtenus après injection simultanée de STH et de L-T_4 sont encore plus évidents. L'augmentation du poids corporel des animaux traités dépasse celle des rats normaux. Les surrénales

des premiers sont légèrement hypertrophiées. La thyroxine renforce donc les effets périphériques de la somatostimuline. L'hormone iodée et l'hormone de croissance agissent synergiquement. Ces observations confirment les conclusions de P. Bois et H. Selye [71]. Elles rejoignent celles de H. Becks et de ses collaborateurs sur l'efficacité de l'association de ces hormones pour réduire le nanisme thyréo-hypophysoprive [68]. Leur action particulièrement nette sur le développement pondéral des surrénales laisse à penser que l'atrophie surrénalienne de l'animal privé de thyroïdes est due à la carence des deux hormones. L'hypothèse selon laquelle la diminution du poids de ces glandes résulterait d'un défaut d'ACTH se trouve d'ailleurs exclue à la suite de nos recherches antérieures.

Parallèlement à l'augmentation pondérale des surrénales, on observe chez les animaux thyroïdectomisés et traités soit par la STH, soit par la STH et T_4, une amélioration de la corticoïdogénèse, plus importante chez les animaux traités à la fois par l'hormone hypophysaire et la tétraiodothyronine. Ceci confirme une fois de plus les propriétés potentialisatrices de la thyroxine. Il convient, certes, d'accueillir avec prudence ces résultats. On peut, en effet, objecter que les préparations de STH utilisées sont suceptibles de contenir des traces d'hormone corticotrope. Les extraits hypophysaires dont nous avons disposé en sont toutefois apparemment exempts. Nous avons pris la précaution de le vérifier en faisant incuber deux lots de quatre paires de surrénales chacun, en présence de 20 Unités Evans d'hormone somatotrope. Les dosages des corticostéroïdes libérés, nous ont fourni des résultats normaux, le taux de ceux-ci étant de 171 µg et 150 µg pour 1 g de surrénales. La restriction de la présence de traces d'ACTH mise à part, nous sommes néanmoins, tenté d'attribuer l'amélioration de la corticoïdogénèse à l'action synergique de l'hormone de croissance et de la thyroxine. La première stimule les mitoses cellulaires et accroît l'anabolisme protéique, La seconde augmente les oxydations tissulaires : propriétés qui, en définitive, favorisent l'activité sécrétrice des surrénales. L'élévation limitée des corticostéroïdes du rat thyroïdectomisé et traité par STH et T_4 n'a sans doute, pas d'autres origines.

Les modifications pondérales d'une part, les variations de la corticoïdogénèse d'autre part, ne sont donc pas, chez l'animal thyroïdectomisé, l'apanage de l'hormone corticotrope. D'autres facteurs interviennent, au premier rang desquels figurent la somatostimuline et les iodothyronines. L'ablation de la thy-

roïde supprime la sécrétion des hormones thyroïdiennes et limite la production de l'hormone de croissance. Cette carence affecte tous les métabolismes en général, et celui de la corticosurrénale en particulier. Elle est responsable de l'atrophie des surrénales et en partie du ralentissement de la corticoïdogénèse constatée chez l'animal thyroïdectomisé. L'hypocorticisme de celui-ci est, vraisemblablement secondaire à une diminution du métabolisme général.

IV. — ACTION *IN VITRO* DU 2-4 DINITROPHÉNOL (DNP) SUR LES SURRÉNALES DU RAT NORMAL ET THYROIDECTOMISÉ.

Les perturbations du métabolisme surrénalien provoquées par la thyroïdectomie ne sont pas, en définitive, secondaires à une hyposécrétion d'ACTH. L'accroissement de la production d'hormone corticotrope après destruction des thyroïdes élimine cette hypothèse. Les modifications pondérales des glandes surrénales doivent plutôt être attribuées à une hyposécrétion d'hormone somatotrope et à l'absence des hormones thyroïdiennes. L'hypertrophie des surrénales constatées après injection de STH et de T_4, l'amélioration simultanée de la corticoïdogénèse indiquent une participation de ces substances dans des processus métaboliques évoluant au sein de la corticosurrénale. Il eut été évidemment intéressant de connaître les effets propres des iodothyronines sur la corticoïdogénèse en les faisant agir directement sur des coupes de surrénales incubées *in vitro*. Un tel projet est difficilement réalisable. On sait, en effet, que les hormones thyroïdiennes n'agissent qu'après un temps de latence plus ou moins prolongé. Cette constatation a soulevé maints problèmes concernant la nature des produits iodés immédiatement actifs au niveau des récepteurs tissulaires et provenant des iodothyronines. Si la découverte des acides iodothyroacétiques a marqué une étape importante dans l'étude du métabolisme tissulaire des hormones thyroïdiennes, ces corps ne semblent pas représenter la « forme active » au niveau de la cellule [81 à 84]. Le problème est, en fait, tout autre. S. Lissitzky d'une part, et J. Tata d'autre part, ont indiqué tout récemment que l'activation des hormones thyroïdiennes serait liée à la formation d'un complexe spécifique intra cellulaire de nature protéique (Thyroxine — binding Protein) [85 et 86]. Il est donc impossible dans ces conditions,

d'utiliser les iodothyronines *in vitro* dans des expériences de courte durée pour juger de leur activité sur la corticoïdogénèse. C'est pourquoi nous avons tenté de tourner ces difficultés.

On sait que l'action des iodothyronines se traduit d'une façon générale par une augmentation des oxydations cellulaires due au découplage des réactions de phosphorylations. Cette propriété est partagée par d'autres substances, et en particulier par le 2-4 dinitrophénol (DNP), considéré comme l'inhibiteur classique de la phosphorylation oxydative [87]. Si les hormones thyroïdiennes et le DNP agissent par des voies différentes, le résultat reste le même. Il n'était donc pas sans intérêt de connaître l'action éventuelle du dinitrophénol sur la corticoïdogénèse chez le rat normal ou thyroïdectomisé.

Vingt paires de surrénales de rats radiothyroïdectomisés depuis cinq semaines ont été incubées dans du liquide de Krebs, pendant 3 heures, en présence de doses variées de DNP (Tableau XXII). Des surrénales de rats normaux ont été utilisées dans les mêmes conditions (Tableau XXII). Les corticostéroïdes libérés ont été dosés par la technique de A. Gor-

TABLEAU XXII.

Taux des corticostéroïdes libérés in vitro par les surrénales de rats normaux ou thyroïdectomisés en présence de 2-4 Dinitrophénol.

Lots d'animaux	Poids des surrénales (mg/4 paires)	2-4 DNP (en µg) ajouté au liquide de Krebs	2-4 DNP µg/ 100 mg de surrénales	Taux des corticostéroïdes (µg/1 g surrénales)
Rats thyroïdectomisés				
Lot 1.....	84	0	0	110
Lot 2.....	92	200	217	174
Lot 3.....	83	150	182	180
Lot 4.....	84	100	119	153
Lot 5.....	84	50	59	150
Rats normaux				
Lot 1.....	114	0	0	171
Lot 2.....	100	200	200	220
Lot 3.....	124	150	120	177
Lot 4.....	128	100	78	171
Lot 5.....	135	50	73	166

NALL et M. MAC DONALD. Leurs taux sont représentés dans le tableau XXII.

Le 2-4 dinitrophénol se montre capable de rétablir la corticoïdogénèse chez l'animal thyroïdectomisé. L'augmentation des corticostéroïdes est particulièrement nette. Elle a été con-

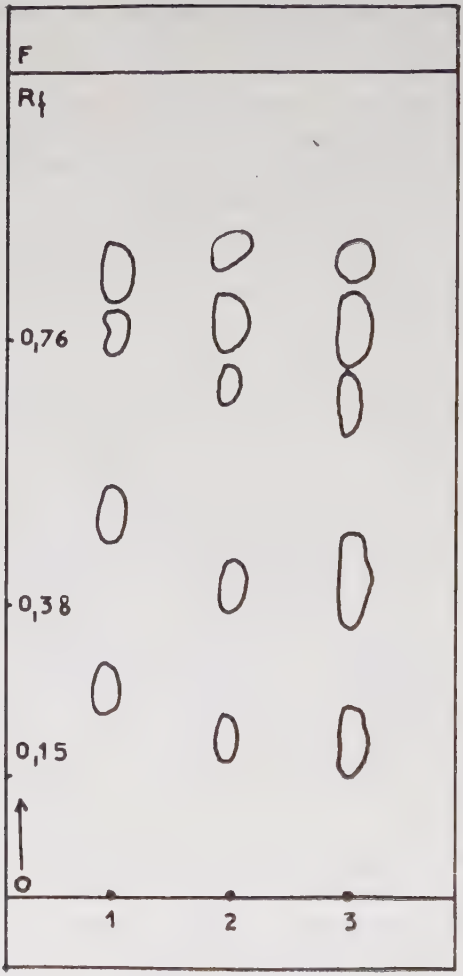


FIG. 24. — Chromatogramme des corticostéroïdes :

1) de référence ;

2) libérés par des surrénales de rats thyroïdectomisés ;

3) libérés par des surrénales de rats thyroïdectomisés incubées en présence de 2-4 DNP.

Système de solvants : Benzène-Méthanol-Eau (100:50:50).

Papier Whatman 1. T° = 30°C.

firmée par chromatographie sur papier dans le mélange benzène-méthanol-eau (100.50.50), des stéroïdes libérés par 95 mg de surrénales incubées en présence de 200 µg de 2-4 DNP. La révélation par le bleu de tétrazolium, l'examen en lumière de Wood laisse apparaître un accroissement de tous les composés stéroïdiques sans distinction de structure (figure 24).

Par contre, la réponse des surrénales de rats normaux est différente. Seule une dose élevée (200 µg) de dinitrophénol se montre capable d'exalter la corticoïdogénèse (Tableau XXII). Des taux inférieurs sont sans effet sur la libération des corticostéroïdes. Dès lors deux questions se posent. Par quel processus le DNP intervient-il dans la biogénèse des stéroïdes, et comment interpréter les différences constatées entre l'animal normal et thyroïdectomisé ?

Il est admis que le dinitrophénol accroît l'activité de l'adénosine-triphosphatase (Atpase) des mitochondries [88 et 89]. L'adénosine-triphosphate (ATP) participe de manière très générale à l'apport de l'énergie dans les réactions métaboliques et il intervient dans les principaux systèmes enzymatiques de la corticoïdogénèse. Il augmente l'action des 21 et 11-hydroxylases, responsables de la transformation de la progestérone en hormones corticosurrénales. Le mode d'intervention du DNP dans la biogénèse des corticostéroïdes est par conséquent aisément explicable.

La comparaison des résultats obtenus avec les surrénales de rats thyroïdectomisés ou normaux fait apparaître quelques divergences. Les premières sont plus sensibles à l'action du DNP que les secondes. Chez ces dernières il semble exister un seuil au-dessous duquel le dinitrophénol est inefficace. On peut supposer que la carence en hormones thyroïdiennes provoque un ralentissement général des réactions de phosphorylation oxydative. La diminution de la consommation d'oxygène chez l'animal thyréoprive en est une manifestation. Il est vraisemblable que les agents de découplage de la phosphorylation tel que le DNP sont susceptibles de produire une relance de celle-ci chez le rat thyroïdectomisé, à des doses inférieures à celles requises par l'animal normal.

Il est donc intéressant de constater que les substances qui, à l'image des hormones thyroïdiennes, agissent sur les oxydations phosphorylantes sont susceptibles d'améliorer la corticoïdogénèse. L'hypocorticisme de l'animal thyroïdectomisé est sans aucun doute attribuable en grande partie au ralentissement de la phosphorylation oxydative engendrée par la carence en hormones thyroïdiennes.

V. — CONCLUSIONS.

La mise en évidence de troubles surrénaliens chez l'animal thyroïdectomisé, devait nécessairement conduire à l'étude de leur origine. C'était en même temps soulever le problème du mode d'intervention des hormones thyroïdiennes dans le métabolisme des corticosurrénales. Si la constatation de faits expérimentaux demeure le principal élément de la recherche biologique, elle doit être complétée par une discussion susceptible d'expliquer les résultats en les coordonnant pour dégager leur signification. C'est pourquoi, nous tenterons de définir le rôle des iodothyronines à l'aide des données expérimentales exposées dans ce chapitre.

Les conséquences corticosurrénales de la thyroïdectomie sont dominées par deux faits essentiels ; l'atrophie des surrénales d'une part, l'hyposécrétion des corticostéroïdes d'autre part. Cette dernière, pressentie à partir de l'étude de l'ascorbie surrénalienne a été confirmée par nos déterminations de stéroïdes. La signification de ces troubles mérite à notre avis d'être discutée séparément.

1) Origine de l'atrophie des surrénales du rat thyréoprive. — Les modifications pondérales ou structurales des surrénales des animaux thyroïdectomisés ont été presque unanimement attribuées à une hyposécrétion de corticostimuline. Cette explication n'est pas valable puisque l'activité corticotrope hypophysaire du rat thyroïdectomisé est légèrement supérieure à celle du rat normal. Il faut donc chercher ailleurs l'origine de l'atrophie surrénalienne. Elle paraît être le résultats de deux facteurs dont on peut se demander s'ils ne sont pas interdépendants : la diminution de la production d'hormone somatotrope d'une part, l'absence de sécrétion thyroïdienne d'autre part. Les arguments ne manquent pas à l'appui de cette thèse. A. Contopoulos, M. Simpson et A. Koueff ont démontré l'abaissement du taux plasmatique de l'hormone de croissance chez le rat thyroïdectomisé [**76**]. Nous avons, en outre déjà signalé les travaux de R. Scow et de W. Marx [**67**], ceux de H. Becks, M. Simpson et de leurs collaborateurs [**68**], de B. Scow et M. Simpson [**4**], démontrant l'action synergique de la thyroxine et de la somatostimuline. L'activité conjointe de ces deux produits hormonaux est particulièrement nette sur le développement pondéral des surrénales. Les expériences de P. Bois et H. Selye sont encore plus significa-

tives, puisqu'elles indiquent clairement que la thyroxine accroît l'hypertrophie surrénalienne provoquée par la STH, mais non celle de l'ACTH [71].

Nous avons constaté que l'administration de L-T_4 ou de L-T_3 à doses physiologiques pendant des périodes plus ou moins longues supprime l'atrophie des surrénales de rats thyroïdectomisés. Celle de somatostimuline produit les mêmes effets. Des traitements plus ou moins prolongés à la 3.5.3'-triiodothyronine, l'association de STH et de T_4 après douze injections provoquent un accroissement pondéral des surrénales des rats thyréoprives supérieur à celui des animaux témoins. Ces faits illustrent l'intervention des hormones thyroïdiennes et somatotrope dans le développement pondéral des surrénales.

Les iodothyronines ont vraisemblablement une double action. Elles interviennent au niveau de l'hypophyse pour régulariser l'élaboration et la sécrétion de l'hormone somatotrope, elles renforcent l'efficacité de celle-ci dans les tissus périphériques. En favorisant la synthèse protéique, en multipliant les mitoses, la STH assure à son tour une augmentation du nombre des cellules et de leur volume. Ces effets se traduisent par un développement de la taille et du poids des glandes et des organes. Ils permettent en même temps une reprise de l'activité endocrine surrénalienne, dont l'amélioration de la corticoïdogénèse en est le témoin. Il faut se garder cependant d'établir un parallélisme rigoureux entre les variations pondérales d'une glande et son activité sécrétrice. Nous avons vu qu'il était aisé de rétablir le poids des surrénales atrophiées, mais non leur corticoïdogénèse. Les expériences effectuées avec le SU. 4885 sont d'ailleurs suggestives sur ce point, puisque cette substance inhibe la biogénèse des corticostéroïdes, mais produit une hypertrophie considérable des surrénales.

Les résultats obtenus à la suite de l'administration de l'hormone somatotrope seule ou en association avec la thyroxine, permettent d'attribuer au défaut de sécrétion de ces hormones la responsabilité de l'atrophie des surrénales des rats thyroïdectomisés. Celle-ci nous apparaît comme une des manifestations secondaires du nanisme thyréoprive.

2) Mode d'intervention des iodothyronines dans la corticoïdogénèse. — L'hypocorticisme du rat thyroïdectomisé n'est pas imputable à un défaut d'ACTH. L'hypersécrétion d'hormone corticotrope constatée chez ces animaux nous a permis d'éliminer cette hypothèse. Nos résultats concordent,

d'ailleurs, avec les expériences effectuées sur des animaux surrénalectomisés. L'hyposécrétion des corticostéroïdes, et la baisse plasmatique qui en résulte, engendrent une hypersécrétion hypophysaire de corticostimuline, conformément à une règle paraissant générale en endocrinologie, à savoir que toute hyposécrétion hormonale provoque en retour une augmentation des stimulines correspondantes. Aussi envisageons-nous une intervention plus ou moins directe des iodothyronines dans les processus d'hormonogénèse corticosurrénale dont nous essayerons de déceler le mécanisme.

L'action combinée des iodothyronines et de la somatostimuline renforce la corticoïdogénèse. Les premières peuvent, en outre, favoriser l'activité de la corticostimuline. Il est également vraisemblable que la consommation tissulaire des corticostéroïdes soit fonction, chez l'animal thyroïdectomisé ou hyperthyroïdien, de la diminution ou de l'exaltation des processus métaboliques. Ces états sont susceptibles d'engendrer en retour une production de corticostéroïdes adaptée aux besoins de l'organisme. Malgré la possibilité de tels phénomènes, il y a tout lieu de croire que la véritable explication se trouve ailleurs. Les surrénales de rats thyroïdectomisés sont beaucoup moins sensibles à l'action de l'A C T H que celle de rats normaux. Malgré un excès de corticostimuline et en dépit des taux anormalement élevés du cholestérol surrénalien, l'augmentation de la corticoïdogénèse y reste limitée, ce qui démontre bien l'origine extra-hypophysaire de cet hypocorticisme. Deux faits méritent de retenir l'attention : d'une part l'accumulation du cholestérol surrénalien chez l'animal thyréoprive et d'autre part l'absence de sa transformation en corticostéroïdes. Il faut rechercher l'explication de l'augmentation du taux du cholestérol surrénalien dans des travaux très récents sur le rôle des hormones thyroïdiennes, et la localisation intracellulaire des différents stades de la corticoïdogénèse. D. Tapley [90], puis D. Tapley et C. Cooper [91] ont montré que les iodothyronines exercent une action directe, à dose physiologique, sur la structure des mitochondries dont elles provoquent le gonflement. Ces auteurs suggèrent que la thyroxine a pour premier et principal effet de régler l'accumulation et la sécrétion c'est-à-dire la distribution de l'eau et des électrolytes au niveau des mitochondries. Ces phénomènes augmentent la perméabilité de la membrane mitochondriale, et engendrent par voie de conséquence un découplage de la phosphorylation oxydative. Cette façon d'envisager le rôle des iodo-

thyronines, étayée par des expériences précises, est pleinement partagée par A. Lehninger [92 et 93]. De plus, le gonflement des mitochondries est suivi de l'augmentation de l'activité de l'adénosinetriphosphatase [94, 95, 96] de la glucose-6-phosphatase [97 et 98] et de l'oxydation du diphosphopyridine nucléotide réduit [99], facteurs essentiels à la corticoïdogénèse [100]. En agissant sur la structure des mitochondries, en modifiant leur perméabilité, les hormones thyroïdiennes règlent donc les entrées et les sorties dans ces substructures cellulaires. Or c'est précisément dans les mitochondries que doit pénétrer le cholestérol surrénalien pour y être transformé en Δ_5-prégnénolone sous l'action de l'A C T H. N. Saba et O. Hechter [101], M. Hayano et ses collaborateurs [102] ont, en effet, localisé la 21-desmolase, responsable de la coupure de la chaîne latérale du cholestérol, dans la fraction mitochondriale du tissu frais homogénéisé de surrénales. Ces constatations jointes aux précédentes indiquent clairement le rôle des iodothyronines dans la corticoïdogénèse. Celles-ci agissent à la manière d'un verrou régularisant l'admission du cholestérol dans les mitochondries. On conçoit l'importance de ce phénomène. Que la sécrétion des hormones thyroïdiennes soit interrompue, l'imperméabilité des mitochondries corticosurrénales freine la pénétration du cholestérol. Il en résulte une diminution de la production des corticostéroïdes et en même temps une accumulation de ce stérol dans les cellules corticales. Au contraire l'injection d'iodothyronines en modifiant la structure mitochondriale chez l'animal thyréoprive, permet une reprise de la corticoïdogénèse. Tel est dans ses grandes lignes notre point de vue sur le mode d'intervention des hormones thyroïdiennes dans les processus de l'hormogénèse corticosurrénale. Les expériences effectuées avec le 2-4 dinitrophénol ont renforcé cette opinion. Il serait, certes, souhaitable de comparer les vitesses de pénétration du ^{14}C-Cholestérol dans les mitochondries des surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés pour obtenir une confirmation rigoureuse de cette explication. On peut néanmoins raisonnablement penser que l'un des principaux effets des hormones thyroïdiennes au niveau du cortex surrénal porte sur la distribution intracellulaire du cholestérol, précurseur des corticostéroïdes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Nous nous sommes proposé d'étudier les relations thyro-corticosurrénales en ce qui concerne la fonction essentielle du cortex surrénal, à savoir la corticoïdogénèse. Seul l'examen des corticostéroïdes, éléments primordiaux de l'activité corticosurrénalienne pouvait conduire dans ce domaine à des résultats précis. Les travaux antérieurs aux nôtres, ont fait état des modifications pondérales et structurales des capsules surrénales, ou des variations de leur teneur en acide ascorbique, après thyroïdectomie ou traitement par les hormones thyroïdiennes. Ces moyens d'étude de l'activité glandulaire ne pouvaient conduire qu'à des données approximatives. Nous espérions aboutir à des conclusions plus concrètes en faisant de l'étude de la corticoïdogénèse la base de notre expérimentation.

I. — Un certain nombre de difficultés se sont présentées ; la plus urgente à résoudre concernait l'étude de l'hormogénèse corticosurrénale. Nous avons choisi, pour diverses raisons, de travailler sur les glandes isolées. Dans l'étude des interrelations glandulaires, il est, en effet, préférable d'utiliser les glandes elles-mêmes. Celles-ci sont, en outre, capables de sécréter leurs éléments hormonaux à des taux qui se prêtent à des caractérisations chromatographiques et à des dosages. Les travaux de M. Saffran et de ses collaborateurs nous ont permis d'utiliser d'emblée, une technique d'étude de la sécrétion *in vitro* des corticostéroïdes par les capsules surrénales, parfaitement adaptée au but que nous nous proposions d'atteindre. Restaient à définir le nombre et la nature des stéroïdes hormonaux sécrétés *in vitro* par les corticosurrénales du rat. Etant donné la pluralité des hormones du cortex surrénal et leur diversité, condition de l'activité biologique de leur sécrétion, il était indispensable de les identifier dans toute la mesure du possible. Les travaux antérieurs laissaient paraître bien des imprécisions, voire même de sérieuses divergences. Les recherches entreprises ont apporté certaines précisions sur la corticoïdogénèse chez le rat. Six corticostéroïdes ont été isolés et

l'identité de certains a pu être déterminée par chromatographie sur papier dans divers systèmes de solvants et par l'emploi de révélateurs permettant la mise en évidence de leurs groupements caractéristiques. Tous les stéroïdes libérés *in vitro*, possèdent la configuration des Δ_4-3 cétostéroïdes. A l'exception du stéroïde X_3, dont la structure n'a pas pu être établie, ils renferment une chaîne α-cétolique réductrice en C_{17}. La corticostérone, la 11-déhydrocorticostérone et l'aldostérone ont été identifiées avec certitude. La nature des stéroïdes X_1 et X_2 demeure inconnue malgré toutes les tentatives effectuées pour la définir. Il n'est cependant pas impossible que le dernier soit apparenté à la 19-hydroxycorticostérone. L'absence de 17-cétostéroïdes et de 17-hydroxycorticostéroïdes, est un élément caractéristique de la corticoïdogénèse chez le rat. Elle lui confère un intérêt particulier du point de vue de la biochimie comparée en raison de l'absence 17-hydroxylase dans le tissu surrénalien de cet animal. Ces précisions ont permis l'adoption d'une méthode de dosage chimique adaptée à la diversité de ces stéroïdes. Les déterminations quantitatives par la technique de A. Gornall et M. Mac Donald, jointes à l'absorptiométrie ultra-violette à 253 mμ ont complété les recherches précédentes. Les principaux stéroïdes, hormis la 11-déhydrocorticostérone, sont sécrétés à des taux voisins. Ces recherches nécessaires pour déterminer le nombre et la nature des corticostéroïdes libérés par la glande du rat et pour évaluer leur importance quantitative relative étaient indispensables pour étudier avec précision les effets de la thyroïdectomie ou des hormones thyroïdiennes.

II. — La thyroïdectomie provoque un hypofonctionnement corticosurrénalien. La biogénèse des corticostéroïdes est partiellement inhibée, ainsi que l'indique la diminution de 40 p. 100 environ de la production des stéroïdes *in vitro*. Il n'y a pas de suppression sélective ; tous les composés hormonaux sont atteints sans distinction de structure ou de fonction biologique. Les surrénales des animaux thyréoprives sont atrophiées, et l'équilibre hydro-minéral est perturbé. La baisse de l'aldostérone se traduit par une chute de sodium sérique et une augmentation du potassium. Elle est responsable de l'élimination accrue de l'eau et du sodium urinaires.

L'administration d'hormones thyroïdiennes, aux doses physiologiques, supprime l'atrophie des surrénales et provoque même une légère hypertrophie mais ne réduit que partielle-

ment l'hyposécrétion des corticostéroïdes. Il n'y a donc pas concordance absolue entre les variations pondérales de ces glandes et leur activité hormonale. L'augmentation des corticostéroïdes n'est, certes, pas négligeable, après administration de 2,5 µg de L-T_3 ou de 5 µg de L-T_4, mais les conditions dans lesquelles nous avons utilisé ces hormones ne nous ont pas permis d'observer un rétablissement complet de la corticoïdogénèse. La dose adoptée, la durée du traitement ont pu suppléer au défaut de la sécrétion endogène thyroïdienne, mais elles ont été insuffisantes pour compenser totalement les désordres causés par la thyroïdectomie. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par les dosages des corticostéroïdes chez des rats ayant reçu pendant 10 jours soit 9 µg de L-T_3, soit 18 µg de L-T_4. Nous avons constaté, au cours de ces expériences, une reprise très nette de la corticoïdogénèse.

III. — Les effets de la 2-Méthyl-1, 2 bis (3-pyridyl)-1-propanone (SU. 4885) et ceux de la thyroïdectomie vis-à-vis des corticostéroïdes s'opposent par bien des points. L'activité inhibitrice de la diméthyl-dipyridyl-propapone, particulièrement intense *in vitro*, se traduit par une inhibition sélective de certaines réactions enzymatiques assurant la biogénèse des corticostéroïdes. La disparition ou la diminution des stéroïdes X_1, X_2, X_3 et de l'aldostérone témoigne des profonds bouleversements que subit cette dernière. La sécrétion de la 11-désoxycorticostérone n'a pas d'autre origine que la suppression de l'activité 11-hydroxylasique et les troubles de l'aldostérone sont imputables au blocage plus ou moins prononcé de la 18-hydroxylase. Le SU. 4885 se présente donc comme une substance anti-hormonale, affectant les principaux systèmes enzymatiques responsables de la formation des stéroïdes corticosurrénaliens. Il agit à un stade avancé de la corticoïdogénèse qu'il est facile de situer exactement C'est au niveau de l'étape 11-désoxycorticostérone-corticostérone qu'apparaissent ses effets. L'incorporation du cholestérol n'est apparemment pas contrariée, et les premières réactions de la corticoïdogénèse s'effectuent normalement.

L'hypocorticisme de l'animal thyroïdectomisé est tout autre. Il s'étend à l'ensemble de la corticoïdogénèse. L'absence d'inhibition sélective affectant préférentiellement tel ou tel stéroïde laisse supposer qu'il résulte d'un ralentissement général du métabolisme de la corticosurrénale. Celui-ci représente un aspect particulier de l'abaissement du métabolisme général de

l'animal thyréoprive. C'est dans le chainon initial de la stéroïdogénèse qu'il faut rechercher l'origine de cet hypocorticisme.

IV. — L'atrophie des capsules surrénales du rat thyroïdectomisé est un trouble général affectant à la fois les parties corticale et médullaire de ces glandes. L'administration d'iodothyronines à des doses physiologiques peut la supprimer alors qu'elle n'a qu'un effet limité sur le rétablissement de la corticoïdogénèse. L'hypocorticisme et la diminution du poids des surrénales semblent donc avoir des origines distinctes. Celle-ci provient vraisemblablement de l'abaissement du taux de sécrétion de la somatostimuline et de la carence en iodothyronines. L'action synergique de ces hormones sur le développement pondéral des capsules surrénales des rats thyréoprives permet d'attribuer l'atrophie surrénalienne de ces animaux aux modifications de leur sécrétion.

V. — Il y avait lieu de s'interroger sur les causes du ralentissement de la biogénèse des corticostéroïdes provoqué par l'ablation du corps thyroïde. Que la plupart des auteurs aient invoqué les variations de la sécrétion hypophysaire de corticostimuline ne saurait surprendre... Les liens sont si étroits entre l'hypophyse et la corticosurrénale qu'il ne semblait pas à priori paradoxal d'avoir recours à l'A C T H pour expliquer ces troubles surrénaliens. En fait, l'hyposécrétion des corticostéroïdes n'est pas due à une baisse de la production de cette stimuline. L'hypophyse du rat thyroïdectomisé libère *in vitro* des quantités d'hormone corticotrope supérieures à celles qui sont normalement excrétées. Cette constatation, en opposition avec l'opinion couramment admise, est conforme aux principes qui règlent les rapports entre les stimulines hypophysaires et les sécrétions hormonales périphériques. La régulation des stimulines de la pré-hypophyse dépend de la teneur plasmatique des hormones qu'elles ont pour mission de stimuler. Que celles-ci viennent à diminuer, l'hypophyse accroît sa production pour réduire le déficit hormonal et relancer l'hormonogénèse. L'hypersécrétion des glandes effectrices freine en retour l'activité hypophysaire. Il est donc logique que l'hypocorticisme du rat thyroïdectomisé puisse accroître le contenu corticotrope de l'hypophyse de cet animal.

En revanche, nous avons constaté que l'injection de 9 µg de L-T_3 ou de 18 µg de L-T_4 pendant 10 jours rétablit l'excrétion normale de l'hormone corticostimulante. De tels faits contre-

disent l'hypothèse de M. et I. Zarrow. Ils nous ont conduits à envisager une intervention plus ou moins directe des iodothyronines dans les processus de l'hormonogénèse corticosurrénalienne. Les résultats obtenus avec le 2-4 dinitrophénol, agent usuel de découplage de la phosphorylation oxydative, ont renforcé cette opinion. On sait, certes, que le découplage de la phosphorylation produit par la thyroxine est secondaire à une altération de la morphologie des mitochondries et non le résultat d'une action directe de cette hormone sur les enzymes de la phosphorylation oxydative. La thyroxine aux doses physiologiques, agit sur la perméabilité des mitochondries dont elle provoque le gonflement. Cette propriété essentielle permet d'expliquer les troubles de la corticoïdogénèse du rat thyroïdectomisé. L'absence d'hormones thyroïdiennes ralentit la pénétration du cholestérol surrénalien dans les mitochondries où s'effectue précisément sa transformation en prégnénolone, première étape de la synthèse des corticostéroïdes. C'est là, qu'il faut voir sans doute, à notre avis, l'origine de l'hypocorticisme du rat thyréoprive. On peut penser qu'il est consécutif à la carence tissulaire en hormones thyroïdiennes dans un organe particulièrement apte à concentrer celles-ci à l'état physiologique ; à cet égard, il peut représenter un aspect particulier de l'abaissement général du métabolisme tissulaire de l'animal thyroïdectomisé.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Hoskins, R. — *Journ. A. M. A.*, 55, 1724, 1910.
2. Ingle, D. et Higgins, G. — *Endocrinology*, 23, 419, 1938.
3. Evans, H., Simpson, M. et Pencharz, R. — *Endocrinology*, 25, 175, 1939.
4. Scow, R., Simpson, M., Asling, C., Li, C. et Evans, H. — The *anatomical record*, 104, 445, 1949.
5. Lowenstein, B. et Zwemer, R. — *Endocrinology*, 33, 361, 1943.
6. Deane, H. et Greep, R. — *Endocrinology*, 41, 243, 1947.
7. Feldman, J. — *The anatomical record*, 109, 41, 1951.
8. Tuchmann-Duplessis, H. — *C. R. ass. anat.*, 39, 424, 1953.
9. Maqsood, M. — *J. Endocrinol.*, 11, 103, 1954.
10. Money, W. L. — in « the Thyroïd ». *Brookhaven Symposia in Biology*, 2, 137, 1955.
11. Sure, B. et Theis, R. — *Endocrinology*, 24, 673, 1939.
12. Wallach, D. et Reineke, E. — *Endocrinology*, 45, 75, 1949.
13. Kimura, M. — *J. Physiol. Soc. Japan.*, 16, 169, 1954.
14. Timiras, P. et Woodbury, D. — *J. Pharm. Exptl. Therap.*, 115, 144, 1955.
15. Eik-Nes, K. et Brizzee, K. — *Amer. J. Physiol.*, 184, 371, 1956.
16. Raynaud, J. — *C. R. Acad. Sci.*, 246, 2173, 1958.
17. Raynaud, J. — *Ann. Endocrinol.*, 19, 1174, 1958.
18. Saffran, M. Grad, B. et Bayliss, M. — *Endocrinology*, 50, 639, 1952.
19. Saffran, M. et Bayliss, M. — *Endocrinology*, 52, 140, 1953.
20. Saffran, M. et Schally, A. — *Endocrinology*, 56, 523, 1955.
21. Heard, R. Jacobs, R. O'Donnel, V. Peron, F. Saffran, M. Solomon, S. Thompson, L. Willoughby, M. et Yates, C. — *Recent progress in hormone research*, 9, 383, 1954.
22. Bush, I. — *J. Endocrinol*, 9, 95, 1953.
23. Elliot, F. et Schally, A. — *Canad. J. of Biochem. and Physiol.*, 33, 174, 1955.
24. Hofmann, F. et Davison, C. — *Endocrinology*, 54, 580, 1954.
25. Singer, B. et Stack-Dunne, M. — *J. endocrinol.*, 12, 130, 1955.
26. Simpson, S. et Tait, J. — *Endocrinology*, 50, 150, 1952.
27. Giroud, C., Safran, M., Schally, A. Stachenko, J. et Venning, E. — *Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med.*, 92, 855, 1956.
28. Ghilain, A., Lafontaine, J. et Schwers, J. — *Ann. endocrinol.*, 19, 152, 1958.
29. Bush, I. — *Biochem. J.*, 50, 372, 1952.
30. Zaffaroni, A., Burton, R. et Keutman, E. — *Science*, 111, 6, 1950.
31. Zaffaroni, A. — *Recent Progress in hormone research*, 7, 255, 1953.
32. Axelrod, L. — *J. Biol. Chem.*, 205, 173, 1953.
33. Bush, I. — in *British Medical Bulletin*, 10, 233, 1954.
34. Burton, R., Zaffaroni, A. et Keutmann, E. — *J. Biol. Chem.*, 188, 763, 1951.

35. Simpson, S., Tait, J., Wettstein, A., Neher, K., Von Euw, J., Schinder, O. et Reichstein, T. — *Helv. chim. Acta*, 37, 1163, 1953.
36. Haines, W. et Drake, N. — *Fed. Proceedings*, 9, 180, 1950.
37. Haines, W. et Karnemaat, J. — in *Methods of Biochemical analysis*, 1, 171, 1954.
38. Neher, R. et Wettstein, A. — *J. Clin. Invest.*, 35, 800, 1956.
39. Rahandraha, Th. et Rakoto Ratsimamanga, A. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 38, 897, 1956.
40. Gray, Ch. — in *Exp. Ann. Bio. Med.*, 18, 47, 1956.
41. Bush, I. — *Biochem. J.*, 59, XIV, 1955.
42. Hayano, M. et Dorfman, R. — *Arch. of Biochem. and Biophys.*, 55, 289, 1955.
43. Levy, H. et Kushinsky, S. — *Arch. of Biochem. and Biophys.*, 55, 290, 1955.
44. Hofmann, F. — *Endocrinology*, 60, 382, 1957.
45. Pincus, G. — *IV th. Intern. Congress of Biochem.*, Vienne, 1958.
46. Mialhe-Voloss, C. et Baulieu, E. — *C. R. Acad. Sci.*, 246, 404, 1958.
47. Porter, C. et Silber, R. — *J. Biol .Chem.*, 185, 201, 1950.
48. Mader, W. et Buck, R. — *Anal. Chem.*, 24, 666, 1952.
49. Gornall, A. et Mac Donald, M. — *J. Biol. Chem.*, 201, 279, 1953.
50. Goldberg, R. et Chaikoff, I. — *Endocrinology*, 45, 64, 1949.
51. Goldberg, R. et Chaikoff, I. — *Endocrinology*, 46, 72 et 91, 1950.
52. Stephan, F., Jahn, H. et Metz, B. — *C. R. Acad. Sci.*, 248, 1227, 1959.
53. Stephan, F., Jahn, H. et Metz, B. — *C. R. Soc. Biol.*, 153, 332 et 463, 1959.
54. Nelson, A. et Woodward, G. — *Arch. of Path.*, 48, 387, 1949.
55. Allen, M. et Corwin A. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 117, 1950.
56. Chart, J., Sheffard, H. Allen, M. Bencze, W. et Gaunt, R. — *Expérientia*, 14, 151, 1958.
57. Liddle, G. Island, D. Lance, E. et Harris, A. — *J. Clin. Endocrin. and Metab.*, 18, 906, 1958.
58. Jenkins, J. Meakin, J. Nelson, D. et Thorn, G. — *Science*, 128, 478, 1958.
59. Jenkins, J., Meakin, J. et Nelson, D. — *Endocrinology*, 64, 572, 1959.
60. Rosenfeld, G. et Bascom, W. — *J. Biol. Chem.*, 222, 565, 1956.
61. Zarrow, M. et Zarrow, I. — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 76, 620, 1951.
62. Eartly, H. et Leblond, C. — *Endocrinology*, 54, 249, 1954.
63. Courrier, R. Roche, J. Michel, O. Michel, R. et Colonge, R. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38, 1245, 1956.
64. Roche, J., Michel, R., Etling et Nunez, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 490, 1956.
65. Roche, J., Michel, R., Jouan, P. et Wolf, W. — *Ann. Pharm. Fr.*, 14, 161, 1956.
66. Roche, J., Michel, R., Jouan, P. et Wolf, W. — *C. R. Soc. Biol.*, 150, 461, 1956.
67. Scow, R. et Marx, W. — *Anat. Rec.*, 91, 227, 1945.
68. Becks, H., Simpson, M., Evans, H., Ray, R., Li, C. et Asling, C. — *Anat. Rec.*, 94, 631, 1946.
69. Selye, H. — *Ann. Endocrinol.*, 14, 372, 1953.
70. Selye, H. et Bois, P. — *J. of Urology*, 77, 1, 1957.
71. Bois, P. et Selye, H. — *J. endocrinol.*, 15, 171, 1957.
72. Mach, R. et Mach, E. — in *Exp. Ann. Biol. Med.*, 18, 63, 1956.
73. Wettstein, A. — in *Exp. Ann. Biol. Med.*, 19, 171, 1957.

74. Pincus, G. — in *Exp. Ann. Biol. Med.*, 18, 1, 1956.
75. Cater, D. et Stack-Dunne, M. — *Acta Endoc.*, 12, 174, 1955.
76. Contopoulos, A. Simpson, M. et Koueff, A. — *Endocrinology*, 63, 642, 1958.
77. Finerty, S. — *Physiol. Rev.*, 32, 370, 1932.
78. Michel, R., Tron-Loisel, M. et Truchot, R. — *C. R. Soc. Biol.*, 153, 569, 1959.
79. Michel, R. Tron-Loisel, M. et Truchot, R. — 84e Congrès des Sociétés Savantes, 1959.
80. Simpson, M., Evans, M. et Li, C. — *Endocrinology*, 33, 261, 1943.
81. Roche, J., Michel, R. et Jouan, P. — *C. R. Acad. Sc.*, 241, 1880, 1955.
82. Roche, J., Michel, R. et Jouan, P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38, 941, 1956.
83. Roche, J., Michel, R. et Jouan, P. — *Endocrinology*, 59, 425, 1956.
84. Roche, J., Michel, R. et Jouan, P. — *Ciba Foundation Colloquia on endocrinology*, 10, 168, 1957.
85. Lissitzky, S. — Réunion commune de la Biochemical Society et de la Société de Chimie Biologique, Paris 27 et 28 Mai, 1960.
86. Tata, J. — Réunion commune de la Biochemical Society et de la Société de Chimie Biologique, Paris 27 et 28 Mai, 1960.
87. Lowy, R. — *Biol. Méd.*, 48, 110, 1959.
88. Lardy, H. et Wellman, H. — *J. Biol. Chem.*, 201, 357, 1953.
89. Cooper, C. — *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 484, 1958.
90. Tapley, D. — *J. Biol. Chem.*, 222. 325, 1956.
91. Tapley, D. et Cooper, C. — *J. Biol. Chem.*, 222, 341, 1956.
92. Lehninger, A. — *J. Biol. Chem.*, 234, 2187, 1959.
93. Lehninger, A. — *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 387, 1960.
94. Lardy, H. et Maley, G. — in Recent Progress in hormone research, 10, 129, 1954.
95. Maryyama, K. et Kobayashi, H. — *Endocrinology*, 59, 213, 1956.
96. Klemperer, H. — *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 404, 1957.
97. Maley, G. et Lardy, H. — *J. Biol. Chem.*, 215, 377, 1955.
98. Harper, A. et Young, C. — *Biochem. J.*, 71, 696, 1959.
99. Dallam, R. et Reed, J. — *J. Biol. Chem.*, 235, 1183, 1960.
100. Pincus, G. — in *Exp. Ann. Biol. Med.*, 18, 1, 1956.
101. Saba, N. et Hechter, O. — *Fed. Proc.*, 14, 775, 1955.
102. Hayano, M., Saba, N. Dorfmann, R. et Hechter, O. — in Recent Progress in hormone research, 12, 79, 1956.

RAPPEL DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE.

1) *Hormones thyroïdiennes :*

T_4 = 3:5:3'.5'.tétraiodothyronine (Thyroxine)
T_3 = 3:5:3'-triiodothyronine
TA_3 = Acide 3:5:3'-triiodothyroacétique.

2) *Hormones hypophysaires :*

A C T H = Hormone corticotrope (corticostimuline)
T S H = Hormone thyréotrope (thyréostimuline)
S T H = Hormone somatotrope (somatostimuline).

3) *Corticostéroïdes :*

E = 11-déhydro, 17-hydroxycorticostérone
F = 17-hydroxycorticostérone
A = Aldostérone
CS = Corticostérone
11DHCS = 11-déhydrocorticostérone
DOC = 11-désoxycorticostérone.

4) SU.4885 = 2-méthyl, 1, 2-bis (3-pyridyl)-1-propanone
DNP = 2-4-dinitrophénol.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

INTRODUCTION 12

OBJET DU TRAVAIL 18

CHAPITRE I.

Etude de la sécrétion *in vitro* des corticostéroïdes par les surrénales du rat.

Introduction 19

I. — Isolement et caractérisation des corticostéroïdes libérés *in vitro* par les surrénales du rat..... 21

A) Technique d'incubation *in vitro* des surrénales du rat 21

B) Isolement et caractérisation des stéroïdes sécrétés *in vitro* par les surrénales du rat. 23

II. — Evaluation du taux des corticostéroïdes sécrétés *in vitro* par les surrénales du rat 33

1) Taux des stéroïdes globaux sécrétés par les surrénales du rat 35

2) Taux des différents stéroïdes sécrétés par les surrénales du rat 36

III. — Discussion des résultats et conclusions 39

CHAPITRE II.

Etude de l'activité corticosurrénalienne du rat thyroïdectomisé et traité par les hormones thyroïdiennes.

Introduction 42

I. — Modifications pondérales surrénaliennes constatées chez le rat thyroïdectomisé et traité par les iodothyronines 45

II. — Etude de l'activité de la corticosurrénale du rat thyroïdectomisé et traité par les hormones thyroïdiennes 47

A) Sécrétion des corticostéroïdes par les surrénales du rat normal et radiothyroïdectomisé 48

B) Sécrétion des corticostéroïdes par les surrénales du rat thyroïdectomisé et traité par les hormones thyroïdiennes 50

Pages

C) Etude du métabolisme hydro-minéral du rat normal, thyroïdectomisé et traité par L-T_3 et TA_3 52

III. — Effets de la 2-méthyl-1, 2 bis (3-pyridyl-1-propanone (SU. 4885) sur la sécrétion des corticostéroïdes 55

A) Action *in vitro* du SU.4885 sur la corticoïdogénèse chez le rat 57

B) Action *in vivo* du SU. 4885 62

C) Discussion des résultats 67

IV. — Conclusions générales 71

Chapitre III.

Recherches sur le mode d'intervention des hormones thyroïdiennes dans la corticoïdogénèse.

Introduction 75

I. — Action de l'hormone corticotrope (ACTH) *in vitro* sur les surrénales de rats normaux et thyroïdectomisés 79

II. — Etude de la sécrétion hypophysaire de l'hormone corticotrope chez le rat normal, thyroïdectomisé et traité par T_3 et T_4 84

A) Description de la méthode de dosage de l'A C T H 85

B) Etude de la sécrétion *in vitro* des corticostéroïdes par les surrénales du rat en présence de doses variées d'A C T H..... 90

C) Etude de l'activité corticotrope hypophysaire de rats normaux, thyroïdectomisés et traités par les iodothyronines 92

III. - Action de l'hormone somatotrope (STH) seule ou associée à la thyroxine (T_4) sur le développement pondéral des surrénales et sur la corticoïdogénèse 97

IV. Action *in vitro* du 2-4 Dinitrophénol (DNP) sur les surrénales du rat normal et thyroïdectomisé. 100

V. Conclusions 104

Conclusions générales 108

Bibliographie 113

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

Les acides gras polyinsaturés dans les algues

Vu :
Le Président de la thèse,
H. LE MOAL.

Vu :
Le Directeur de thèse,
J. ROCHE.

Vu et approuvé :
Rennes, le 28 février 1961.
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
R. POISSON.

Vu et permis d'imprimer N° 447 :
Rennes, le 3 mars 1961.
Le Recteur de l'Académie de Rennes,
H. LE MOAL.

Achevé d'imprimer le 6 mars 1961.

M. Declume, Imprimeur, Lons-le-Saunier. — 39-61-230.
Mars 1961 « Dépôt légal 1er trimestre 1961 — N° 5148 ».